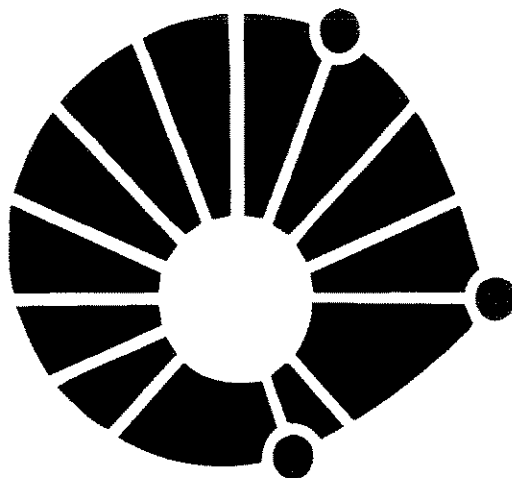


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS
BIOTECNOLÓGICOS



UNICAMP

**OTIMIZAÇÃO DE SISTEMA DE FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA
CONTÍNUA UTILIZANDO REATORES TIPO TORRE E
LEVEDURAS COM CARACTERÍSTICAS FLOCULANTES**

Autor: Marcelo Caldeira Viegas
Engenheiro Químico, UEM, 1996

Orientador: Prof. Dr. Sílvio Roberto Andrietta

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química

Campinas – São Paulo

Abril/2003

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	V671o
V	EX
TOMBO BC	56810
PROC	16/11/04
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	19/01/2004
Nº CPD	

CM00194150-8

BIBID 309727

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

V671o Viegas, Marcelo Caldeira
Otimização de sistema de fermentação alcoólica
contínua utilizando / Marcelo Caldeira Viegas. --
Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Silvio Roberto Andrietta.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Fermentação. 2. Leveduras (Fungos). 3. Alcool.
4. Modelagem de dados. I. Andrietta, Silvio Roberto.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. III. Título.

Tese de Doutorado defendida pelo Eng. Marcelo Caldeira Viegas e aprovada em 25 de abril de 2003 pela banca examinadora constituída pelos professores doutores:



DR. SÍLVIO ROBERTO ANDRIETTA
(ORIENTADOR)



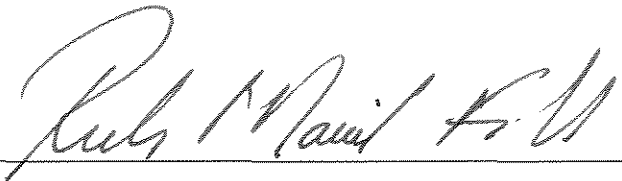
DR. JOSÉ PAULO STUPIELLO
(MEMBRO)



DRA. MARIA HELENA ANDRADE SANTANA
(MEMBRO)



DR. FRANCISCO MAUGERI FILHO
(MEMBRO)



DR. RUBENS MACIEL FILHO
(MEMBRO)

2003, 21/5

Esta versão corresponde a redação final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida pelo Eng. Marcelo Caldeira Viegas e aprovada pela Comissão Julgadora em 25/04/2003.



Prof. Dr. Sílvia Roberto Andrietta
(ORIENTADOR)

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original”.

(Albert Einstein)

*Dedico este trabalho
aos meu pais Wilson Viegas (in memorian) e Mercedes Caldeira Viegas
pelo amor que sempre me dedicaram
, a minha filha Giovanna luz da minha vida e a minha noiva Cristiane (mulher da
minha vida).*

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. Sílvio Roberto Andrietta pela orientação e amizade.
- A FAPESP pelo financiamento parcial deste projeto até 07/01/2003, na forma de bolsa de estudo e reserva técnica.
- Aos meus Pais Wilson e Mercedes que sempre me incentivaram.
- Aos colegas da FEQ pela amizade.
- Aos professores da FEQ/DPB pelo ensino e auxílio.
- Aos amigos: Cláudia, Graça, Cibele, Milene, Érica, Gisele, Roberta, Alex pela demonstração de amizade, apoio e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.
- Aos membros da Banca Examinadora pelas contribuições.
- Aos professores Dra. Maria Helena de Andrade Santana (FEQ/UNICAMP) e Dr. Francisco Maugeri Filho (FEA/UNICAMP) pelas contribuições e sugestões durante a realização deste trabalho.
- À Citrosuco/ Matão-SP e as Usinas: Estér (Cosmópolis/SP), Alvorada (Araguari/MG) e Santa Cândida (Bocaina/SP) pela contribuição nos testes com matérias-primas de uso industrial.
- Ao CPQBA/UNICAMP pela realização deste trabalho.
- A Cia. Iguaçu de Café Solúvel pela minha contratação na Pesquisa & Desenvolvimento, e pelo apoio prestado no final deste trabalho.

MUITO OBRIGADO.

SUMÁRIO

<u>NOMENCLATURA</u>	<i>xii</i>
<u>RESUMO</u>	<i>xiii</i>
<u>SUMMARY</u>	<i>xiv</i>
<u>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO</u>	<i>1</i>
<u>OBJETIVO</u>	<i>2</i>
<u>1 INTRODUÇÃO</u>	<i>2</i>
<u>1.1 Evolução dos Processos de Fermentação Alcoólica</u>	<i>2</i>
<u>1.2 Processos Fermentativos Contínuos</u>	<i>3</i>
<u>1.2.1 Arranjo dos Reatores</u>	<i>5</i>
<u>1.2.1.1 Fermentação em Dorna Única</u>	<i>5</i>
<u>1.2.1.1.1 Processo Biostil</u>	<i>5</i>
<u>1.2.1.1.2 Processo Hoechst-Uhde</u>	<i>6</i>
<u>1.2.1.1.3 Processo Fercen</u>	<i>6</i>
<u>1.2.1.2 Fermentação em Cascata</u>	<i>6</i>
<u>2 PROPOSTA E JUSTIFICATIVA DO PROJETO</u>	<i>7</i>
<u>3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<i>9</i>
<u>CAPÍTULO 2 - SELEÇÃO DA CEPA A SER UTILIZADA NO SISTEMA DE REATORES</u>	<i>11</i>
<u>OBJETIVO</u>	<i>13</i>
<u>1 INTRODUÇÃO</u>	<i>13</i>
<u>1.1 Fatores que Influenciam na Floculação de Leveduras</u>	<i>13</i>
<u>2 MATERIAIS E MÉTODOS</u>	<i>14</i>
<u>2.1 Descrição do Sistema de Diluição em Linha</u>	<i>14</i>
<u>2.2 Substrato Concentrado</u>	<i>15</i>
<u>2.3 Descrição dos reatores</u>	<i>16</i>
<u>2.4 Seleção de cepas a serem utilizadas no sistema</u>	<i>16</i>
<u>2.4.1 Seleção através da dinâmica populacional em fermentador de bancada</u>	<i>16</i>
<u>2.4.1.1 Microrganismos</u>	<i>16</i>
<u>2.4.1.2 Inóculo</u>	<i>17</i>
<u>2.4.1.3 Avaliação da Capacidade Fermentativa (CF)</u>	<i>17</i>
<u>2.4.1.4 Velocidade Específica de Sedimentação (VES)</u>	<i>17</i>
<u>2.4.1.5 Determinação da taxa específica de crescimento celular</u>	<i>18</i>

2.4.1.5.1	Cálculo da taxa específica de crescimento celular	18
2.4.1.6	Crescimento e Retenção de Células no Sistema de Fermentadores	19
2.4.1.7	Condução dos Ensaios da Seleção de Cepas através da dinâmica Populacional	19
2.4.2	Testes das Cepas Formadoras de “Pellets” no Sistema de Fermentadores	20
2.4.2.1	Microrganismo	20
2.4.2.2	Inóculo	21
2.4.2.3	Condução dos Ensaios	21
2.5	Métodos Analíticos	22
2.5.1	Determinação de Glicose, Frutose, Sacarose, Glicerol e Etanol	22
2.5.2	Determinação do Brix Refratométrico (% de sólidos solúveis p/p)	22
2.5.3	Contagem de leveduras	22
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
3.1	Seleção através da dinâmica populacional em fermentador de bancada	23
3.2	Testes das Cepas Formadoras de “Pellets” no Sistema de Reatores	26
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
CAPÍTULO 3 - AJUSTE DOS PARÂMETROS CINÉTICOS		33
OBJETIVO		34
1	INTRODUÇÃO	34
1.1	Cinética da Fermentação Alcoólica	34
1.1.1	Modelos cinéticos	34
1.2	Modelos Matemáticos Aplicados À Fermentação Contínua Utilizando Leveduras Floculantes	40
2	MATERIAIS E MÉTODOS	42
2.1	Obtenção dos Dados Experimentais Utilizados no Ajuste dos Parâmetros Cinéticos	43
2.1.1	Linhagem	43
2.1.2	Inóculo	43
2.1.3	Substrato de Alimentação	43
2.1.4	Condução dos Ensaios para Obtenção dos Dados Experimentais	43
2.2	Ajuste dos Parâmetros Cinéticos Considerando uma Única Fonte de Substrato (ART)	44
2.2.1	Modelos Cinéticos Testados	44
2.3	Ajuste dos Parâmetros Cinéticos Considerando duas Fontes de Substrato (Glicose e Frutose)	47
2.3.1	Obtenção dos Dados Experimentais	47
2.3.2	Modelo Cinético Testado Considerando a Presença de dois Substratos (Glicose e Frutose)	47
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49

<u>3.1</u>	<u>Ajuste dos Parâmetros Cinéticos Considerando uma Única Fonte de Substrato (ART)</u>	49
<u>3.2</u>	<u>Ajuste dos Parâmetros Cinéticos considerando duas fontes de substrato (Glicose e Frutose)</u>	56
<u>4</u>	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	62
<u>CAPÍTULO 4 - OTIMIZAÇÃO OPERACIONAL DO ARRANJO ÓTIMO DE REATORES</u>		67
<u>OBJETIVO</u>		68
<u>1</u>	<u>INTRODUÇÃO</u>	68
<u>1.1</u>	<u>Bioreatores Tipo Torre Utilizando Leveduras Floculantes</u>	68
<u>1.2</u>	<u>Planejamento Fatorial Completo</u>	70
<u>2</u>	<u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	71
<u>2.1</u>	<u>Linhagem</u>	72
<u>2.2</u>	<u>Arranjos de Reatores Testados</u>	73
<u>2.2.1</u>	<u>Arranjo 1</u>	74
<u>2.2.2</u>	<u>Arranjo 2</u>	75
<u>2.2.3</u>	<u>Arranjo 3</u>	76
<u>3</u>	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	78
<u>3.1</u>	<u>Otimização Operacional do Arranjo de Reatores</u>	78
<u>3.1.1</u>	<u>Otimização - Arranjo 1</u>	78
<u>3.1.1.1</u>	<u>Rendimento Arranjo 1</u>	79
<u>3.1.1.2</u>	<u>Produtividade Arranjo 1</u>	85
<u>3.1.1.3</u>	<u>Definições da faixa ótima de operação - Arranjo 1</u>	90
<u>3.1.2</u>	<u>Otimização - Arranjo 2</u>	91
<u>3.1.2.1</u>	<u>Rendimento Arranjo 2</u>	92
<u>3.1.2.2</u>	<u>Produtividade Arranjo 2</u>	97
<u>3.1.2.3</u>	<u>Definições da faixa ótima de operação - Arranjo 2</u>	102
<u>3.1.3</u>	<u>Otimização - Arranjo 3</u>	103
<u>3.1.3.1</u>	<u>Rendimento - Arranjo 3</u>	103
<u>3.1.3.2</u>	<u>Produtividade arranjo 3</u>	108
<u>3.1.3.3</u>	<u>Definições da faixa ótima de operação - Arranjo 3</u>	113
<u>3.1.4</u>	<u>Escolha do Melhor Arranjo</u>	113
<u>4</u>	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	115
<u>CAPÍTULO 5 - TESTE DO ARRANJO ÓTIMO COM MATÉRIAS-PRIMAS DE USO INDUSTRIAL</u>		117
<u>OBJETIVO</u>		118
<u>1</u>	<u>INTRODUÇÃO</u>	118

<u>2</u>	<u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	<u>118</u>
<u>2.1</u>	<u>Méis Provenientes de Fábricas de Açúcar com Diferentes Níveis de Esgotamentos</u>	<u>118</u>
<u>2.1.1</u>	<u>Caracterização dos Méis</u>	<u>119</u>
<u>2.1.2</u>	<u>Condução dos Ensaio Utilizando Méis com Diferentes Níveis de Esgotamento</u>	<u>119</u>
<u>2.2</u>	<u>Materiais Efluentes de Industrias de Alimentos</u>	<u>119</u>
<u>2.2.1</u>	<u>Tratamento da Matéria-prima (Licor de primeira pressão)</u>	<u>119</u>
<u>2.2.2</u>	<u>Caracterização do Licor de Primeira Pressão</u>	<u>120</u>
<u>2.2.3</u>	<u>Condução dos Ensaio Utilizando Licor de Primeira Pressão</u>	<u>120</u>
<u>3</u>	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	<u>121</u>
<u>3.1</u>	<u>Méis provenientes de Fábricas de açúcar com diferentes níveis de esgotamentos</u>	<u>121</u>
<u>3.2</u>	<u>Materiais efluentes de industrias de alimentos (Licor de Primeira Pressão)</u>	<u>124</u>
<u>CAPÍTULO 6 -</u>	<u>CONCLUSÕES</u>	<u>127</u>
<u>OBJETIVO</u>		<u>128</u>
<u>CAPÍTULO 7 -</u>	<u>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</u>	<u>131</u>
<u>CAPÍTULO 8 -</u>	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>133</u>

NOMENCLATURA

D	Taxa de diluição	h^{-1}
$K_1, K_2, K_2,$ $K_4, K_a, K_b,$ K_c	Constantes Cinéticas	
K_s	Constante de Monod	
n	Potência	
P	Concentração de produto (etanol)	(Kg/m^3)
$P_{m\acute{a}x}$	Concentração máxima de etanol acima da qual não há crescimento	(Kg/m^3)
Prod.	Produtividade em etanol	$(Kg_{Etanol}/m^3.h)$
r_x	Taxa de produção de células	
S	Concentração de substrato	(Kg/m^3)
X	Concentração celular	(Kg/m^3)
$Y_{p/s}$	Rendimento de reação: Produto formado/ substrato consumido	
$Y_{x/s}$	Produção de células: massa celular produzida/ substrato consumido	

Letras Gregas

$\mu_{m\acute{a}x}$	Taxa específica máxima de crescimento	(h^{-1})
μ	Taxa específica de crescimento	(h^{-1})
μ_i	Taxa específica máxima de crescimento à concentração zero de etanol	(h^{-1})
λ	Comprimento de onda	(nm)

RESUMO

Este trabalho tem por objetivo determinar o arranjo ótimo de um sistema de fermentação constituído de reatores tipo torre para produção de etanol utilizando leveduras com características floculantes. Buscou-se nesta otimização atingir alta produtividade mantendo o rendimento em etanol compatível aos níveis industriais, sem a necessidade de se utilizar unidade de separação de células (centrífuga), visando assim à redução do custo de produção do etanol em torno de 15%. Nos experimentos foi utilizada uma linhagem de levedura previamente selecionada isolada da unidade de fermentação industrial da Usina Junqueira (Igarapava/SP) durante a safra de 2000. Na otimização operacional do arranjo de reatores o substrato utilizado na alimentação do sistema foi um meio sintético concentrado a base de sacarose, diluído em linha para as concentrações definidas para cada ensaio realizado. Foram testados três arranjos constituídos cada um por três reatores, sendo eles: (a) Arranjo 1- Constituído de um sistema composto por três reatores ligados em série, onde vinho fermentado proveniente do primeiro reator alimentou o segundo reator e o vinho proveniente deste alimentou o terceiro reator, (b) Arranjo 2- Constituído de um sistema composto de três reatores, sendo que os dois primeiros são ligados em paralelo cuja vazão de alimentação em cada reator é 50% da vazão total. O vinho fermentado proveniente destes alimentou um terceiro reator que está ligado em série com os dois primeiros e (c) Arranjo 3- Constituído de três reatores ligados em série sendo que o primeiro reator recebeu metade da alimentação total, o efluente proveniente deste alimentou o segundo reator juntamente com a outra metade da alimentação, o efluente proveniente do segundo reator alimentou o terceiro. Os ensaios realizados para cada arranjo foram conduzidos segundo o planejamento fatorial completo e otimizado segundo o método de superfície de resposta. Para realização destes ensaios as variáveis independentes ($n=2$) estudadas foram: (a) concentração de substrato na alimentação (variando entre 150 a 200 g/l) e (b) tempo de residência (variando entre 3 a 4 h). As variáveis respostas foram o rendimento em etanol e a produtividade do sistema. Dentre os três arranjos estudados o arranjo 3 apresentou produtividade máxima de 27,39 g Etanol/L.h superior aos 26,29 g Etanol/L.h e 21,68 g Etanol/L.h dos arranjos 1 e 2 respectivamente, sendo, portanto o arranjo selecionado como ótimo. Após a obtenção do arranjo ótimo, foi estudado o desempenho do mesmo com diferentes meios industriais (méis de Usina de Açúcar com diferentes graus de esgotamento e resíduos açucarados proveniente da última prensagem do bagaço de laranja da fábrica de suco concentrado). Modelos matemáticos foram desenvolvidos e parâmetros cinéticos ajustados para poder, através de simulação em computador, entender melhor a dinâmica do processo. A modelagem matemática do reator foi realizada considerando-o como tubular sem dispersões axial e radial. A concentração de células foi considerada decrescente ao longo do reator, devido ao incremento da porosidade do leito na parte superior do mesmo. Foram testados modelos cinéticos da literatura, do tipo não estruturados e não segregados, com termos de inibição pelo produto, substrato, células e limitação pelo substrato. Os resultados obtidos mostram que os modelos que levam em consideração o efeito do substrato limitante, inibição pelo substrato e produto apresentaram o melhor ajuste aos dados experimentais.

Palavras-chave: fermentação alcoólica contínua, leveduras floculantes, reatores tipo torre, etanol.

SUMMARY

This work aims to determine the optimum design of a fermentation system, constituted by tower reactors for ethanol production by making use of yeast with flocculating characteristics. We sought, through this optimization, to reach high productivity keeping the ethanol yield compatible to industrial levels, without having to use cell separation unity (centrifuge), aiming at the reduction in ethanol production costs at about 15%. A previously selected yeast strain was used in the experiment, collected from an industrial fermentation unity at Usina Junqueira (Igarapava/SP) during the crop in the year 2000. In the operational optimization of the reactors' design, the substrate used in the feeding of the system was a synthetic medium concentrated on a sucrose basis, diluted in line for the defined concentrations in each test. Three designs were tested, each one constituted by three reactors: (a) Design 1 – constituted by a system of three reactors connected in series, where fermented wine from the first reactor fed the second one and the wine from the second fed the third one; (b) Design 2 – constituted by a system of three reactors, in which the first two are connected in parallel and whose outflow from each one corresponds to 50% of the total. The fermented wine from them fed a third reactor which is connected in series to the first ones and (c) Design 3 – constituted by three reactors connected in series from which the first reactor received half the total feeding, and the outflow from it fed the second reactor with half the feeding, and the outflow from the second reactor fed the third one. The tests were carried out according to experimental design and optimized according to response surface. For the completion of these tests, the independent variables ($n=2$) studied were: (a) substrate concentration in the feeding (ranging from 150 to 200 g/l) and (b) residence time (ranging from 3 to 4 h). The variable answers were the ethanol yield and the system productivity. From the three designs studied, the third one showed a maximum productivity of 27.39 g Ethanol/L.h higher than the 26.29 g Ethanol/L.h and 21.68 g Ethanol/L.h from the first and second designs, respectively; therefore, considered optimum. After obtaining the optimum design, its performance with industrial media was studied (honeys from Sugar Plant at different levels of exhaustion and sugar residues from the last pressing of orange pulp from a concentrated juice factory). Mathematical models were developed and kinetic parameters were adjusted, through computer simulation, in order to better understand the dynamics of the process. The mathematical modelling of the reactor was carried out considering it tubular without axial or radial dispersion. The concentration of cells was considered decreasing along the reactor, due to the development of bed porosity in its upper part. Kinetic models from literature were tested, non-structured and non-segregated types in terms of inhibition by the product, substrate, cells and limitation by the substrate. The obtained results show that the models which take into account the effect of the limiting substrate, inhibition by the substrate and product presented the best adjustment to the experimental data.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

ÍNDICE

<u>OBJETIVO</u>	<u>2</u>
<u>1 INTRODUÇÃO</u>	<u>2</u>
<u>1.1 Evolução dos Processos de Fermentação Alcoólica</u>	<u>2</u>
<u>1.2 Processos Fermentativos Contínuos</u>	<u>3</u>
<u>1.2.1 Arranjo dos Reatores</u>	<u>5</u>
<u>1.2.1.1 Fermentação em Dorna Única</u>	<u>5</u>
<u>1.2.1.1.1 Processo Biostil</u>	<u>5</u>
<u>1.2.1.1.2 Processo Hoechst-Uhde</u>	<u>6</u>
<u>1.2.1.1.3 Processo Fercen</u>	<u>6</u>
<u>1.2.1.2 Fermentação em Cascata</u>	<u>6</u>
<u>2 PROPOSTA E JUSTIFICATIVA DO PROJETO</u>	<u>7</u>
<u>3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>9</u>

OBJETIVO

Neste capítulo será apresentado um panorama geral da produção industrial de etanol no Brasil, além de apresentar os objetivos principais, justificativas e aspectos relevantes envolvidos neste trabalho.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Evolução dos Processos de Fermentação Alcoólica

Um grande avanço na produção industrial de etanol foi alcançado na década de 30, quando surgiu na França o processo Melle-Boinot (ALMEIDA, 1960). Segundo LIMA (1960), até o início dos anos 60 os processos de corte e de utilização de pé-de-cuba individual (clássico) eram bastante utilizados na fermentação de melaço nas indústrias brasileiras. DREWS (1964) comenta que este processo após 1964 estava presente somente em destilarias de pequeno porte e estava sendo rapidamente substituído pelo processo Melle-Boinot (batelada alimentada com reciclo de células).

A utilização do processo Melle-Boinot nas plantas de produção de etanol brasileiras se generalizou no final da década de 60 e nos anos 70. Segundo ZARPELLON & ANDRIETTA (1992) todas as destilarias instaladas quando da criação do Programa Nacional do Alcool (1976), foram equipadas com este processo.

A eficiência do processo Melle-Boinot unida aos problemas das primeiras plantas de fermentação contínua surgidas no Brasil atrasaram a implantação deste processo na indústria, já que a grande maioria das instalações de fermentação contínua daquela época eram adaptações de baixo custo feitas em processos de bateladas pré-existentes. Segundo FINGUERUT *et.al* (1992), apesar da fermentação contínua ser uma evolução natural do processo batelada-alimentada, não é um desenvolvimento recente. Estes mesmos autores citam a existência de instalações industriais na França na década de 30, operando com melaço de beterraba.

BORZANI (1960) cita vários trabalhos sobre fermentação contínua dando como vantagens desse processo: maior produtividade; maior uniformidade do produto; e maior adaptabilidade de automação. Segundo este mesmo autor, na década de 60 eram poucos os casos onde os processos fermentativos contínuos apresentavam aplicação industrial. A utilização do processo contínuo de fermentação alcoólica na indústria brasileira iniciou-se nos anos 70.

Segundo ZAPERLLON & ANDRIETTA (1992) o interesse pelo processo de fermentação alcoólica contínua foi acelerado no Brasil a partir da última década, como forma de se reduzir os custos de produção, de modo a reduzir o volume de vinhoto produzido e o consumo de vapor necessário. Atualmente cerca de 40% das unidades industriais brasileiras trabalham com processos de fermentação contínua.

Os estudos em escala piloto de fermentação contínua utilizando leveduras floculantes tiveram início nos anos 80. O objetivo desses processos era trabalhar com leveduras que, em função de suas características floculantes, permitisse eliminar a fase de centrifugação necessária para separar as células do vinho fermentado. Segundo BU'-LOCK (1983) os sistemas de reatores de leito fluidizado com células de leveduras floculantes apresentam alta estabilidade e produtividade (25 mL Etanol/ L.h), enquanto que os processos contínuos otimizados com centrifugação de células atingem 12 mL Etanol/L.h.

1.2 Processos Fermentativos Contínuos

Segundo ANDRIETTA (1994), o processo de fermentação alcoólica contínua pode ser dividido em 3 partes: unidade de tratamento ácido, fermentadores e unidade de separação de células (centrífugas). As células de leveduras, após terem sido submetidas ao tratamento ácido (fermento tratado), deixam as unidades de tratamento e são misturadas com o meio de alimentação (mosto). Esta mistura é então enviada aos fermentadores, onde a razão entre a vazão de fermento tratado e a vazão total de alimentação dos fermentadores é chamada de taxa de reciclo.

Depois de ocorrida a transformação dos açúcares em etanol, o vinho fermentado contendo células de leveduras (vinho bruto) é enviado para a unidade de separação. Esta unidade é constituída de separadoras centrífugas de prato que trabalham a uma velocidade angular de 8000 rpm. Estas separadoras recebem o vinho bruto contendo de 30 a 45 g de

células por litro de vinho e fornecem 2 produtos: uma fase leve e outra pesada. A fase pesada contendo entre 160 a 200 g de células por litro é chamada de creme de levedura. Este creme é enviado para a unidade de tratamento ácido. A fase leve, praticamente isenta de células de levedura (concentração máxima permitida 3 g de células por litro) é chamado de vinho delevedurado e é enviado ao tanque pulmão da unidade de destilação, também chamada de dorna volante.

O número total de dornas de fermentação e o volume relativo de cada uma delas tem sido objeto de estudo para diversos pesquisadores. GHOSE & TYAGI (1979) concluíram que na operação utilizando-se duas dornas iguais em série, o volume total de reatores é 58% menor que se usando um reator. Mais recentemente, em trabalho de simulação, ANDRIETTA (1994) concluiu que o sistema ótimo é constituído por quatro reatores de mistura perfeita ligados em série com 1,5; 1,9; 2,2; e 1,45 hora de tempo de residência.

GUERREIRO (1995) cita que o avanço tecnológico gerado pela adoção de técnicas modernas (cinética microbiana adequada, otimização, simulação de processos via computador e projetos específicos), aliados à fermentação contínua, pode trazer os seguintes benefícios: modernização das usinas; redução dos gastos de mão de obra; aumento de produtividade; trabalho em estado estacionário; redução de insumos; uniformidade do produto; maior controle operacional do processo.

CYSEWSKI & WILKE (1978) e MAIORELLA *et al.* (1984) realizaram estudos comparativos e avaliações econômicas dos diversos processos existentes para a produção de etanol via fermentativa. Ambos os trabalhos citam que os gastos com matérias primas (principalmente melaço) representam cerca de 70% do custo total de produção do etanol, mas melhorias são observadas nos processos contínuos em relação ao processo batelada. MAIORELLA *et al.* (1984) simulando uma destilaria para produção de 10^9 L/ano de etanol 95% p/p, concluíram que o custo total de produção na fermentação contínua com reciclo de células operando com concentração celular de 100g/L e produtividade de 42,5 g/L.h é de R\$ 0,49/L, e para uma fermentação contínua com concentração celular de 20 g/L e produtividade 14,1 g/L.h está em R\$ 0,51/L, enquanto que para uma fermentação batelada tradicional cuja concentração celular no final da fermentação é de 21 g/L e produtividade 11,8 g/L.h é de R\$ 0,53/l.

Porém ganhos significantes no investimento de capital fixo são demonstrados por CYSEWSKI & WILKE (1978). Estes demonstraram uma redução de 57% no capital investido em destilarias contínuas quando comparadas ao processo de batelada tradicional. Reduções maiores, na ordem de 68 e 71% são conseguidos respectivamente para os processos via fermentação contínua com reciclo de células e de operação à vácuo.

Como demonstrado por PAIVA *et al.* (1996) é possível operar um reator tipo torre com alta concentração de células e alta produtividade (18 g Etanol / L x h) utilizando decantadores como unidade de separação quando a cepa de levedura utilizada possui características floculantes, o que diminuí os custos de produção deste combustível.

1.2.1 Arranjo dos Reatores

Segundo ZAPERLON & ANDRIETTA (1992) vários processos para fermentação contínua tem sido utilizados e alguns dos quais não tiveram êxito. Os principais processos podem ser divididos em dois grupos: (a) *Fermentação em dorna única*: onde todo o processo é realizado numa única dorna, de mistura completa, onde o teor de açúcares e de etanol é constante e (b) *Fermentação em cascata*: onde as dornas individuais são conectadas em série, passando-se consecutivamente de uma para outra, assemelhando-se a uma “cascata”.

1.2.1.1 Fermentação em Dorna Única

Três processos de fermentação em dorna única foram testados no Brasil: Biostil, Hoechst-Uhde e Fercen. ZAPERLON & ANDRIETTA (1992) descrevem as principais características de cada um desses processos.

1.2.1.1.1 Processo Biostil

Foi desenvolvido pela Alfa-Laval e no início dos anos 80 foi introduzido no Brasil através da Codistil. Este Processo visa o processamento de subprodutos com alto brix e a recirculação de vinhaça para a preparação do mosto e desta forma, produzir baixos volumes de vinhoto. Devido a alta pressão osmótica do meio, é utilizada uma levedura específica para estas condições. O creme de leveduras obtido das separadoras de fermento é reciclado sem

diluição. Ácido sulfúrico é utilizado de forma a manter um pH de 4,5. O processo Biostil foi abandonado, devido as dificuldades de se manter condições estáveis na fermentação.

1.2.1.1.2 Processo Hoechst-Uhde

Este processo visa eliminar o uso das separadoras de fermento e, para isto, uma levedura floculante é utilizada. O fermentador é basicamente uma torre onde o diâmetro no topo era maior que o corpo, objetivando servir como separador das leveduras. O vinho saindo da torre é enviado para outro tanque de sedimentação para nova separação de leveduras, que são recicladas ao fermentador principal. Ácido sulfúrico e eventualmente ácido fosfórico são adicionados para manter o pH em 4,0 durante a fermentação. As dificuldades de operação do sistema devido a performance irregular, baixo teor alcoólico e baixa eficiência levaram ao abandono deste processo.

1.2.1.1.3 Processo Fercen

O processo Fercen introduzido pelo Engenho Novo opera com fermentadores individuais em paralelo, onde a fermentação é feita em dornas agitadas. A concentração de açúcar é mantida abaixo de 1 g/L. O vinho saindo das dornas é enviado para separadoras de fermento, sendo o creme de leveduras reciclado, sem diluição, às dornas. Eventualmente ácido sulfúrico é adicionado usando-se misturadores.

1.2.1.2 Fermentação em Cascata

Há, no mínimo, quatro processos principais de fermentação em cascata operando com sucesso no Brasil: da Usina Vale do Rosário, Copersucar, Codistil e BIOES. Na essência, todos os processos de fermentação em cascata são similares, sendo as principais diferenças nas estratégias de superar o acúmulo de sólidos no fundo das dornas e do número de estágios que utilizam. Onde boas condições de operação estão presentes, a fermentação em cascata mostra um comportamento muito ativo, especialmente no primeiro e segundo estágios onde grande desprendimento de dióxido de carbono pode ser observado. Todos os processos de fermentação em cascata praticados no Brasil operam com reciclagem das leveduras para obter alta velocidade de fermentação e alto teor alcoólico (10 °GL), com eficiências normalmente na ordem de 90% (ZAPERLON & ANDRIETTA, 1992).

2 PROPOSTA E JUSTIFICATIVA DO PROJETO

Nos últimos anos, devido à diminuição do consumo de etanol causado pela redução do número de carros movidos a álcool, as unidades produtoras vêm trabalhando no sentido de minimizar o custo de produção deste combustível, visando tornar viável sua utilização.

Para que este objetivo seja atingido, se faz necessário realizar pesquisas que permitam otimizar os processos industriais, pois, apesar de ser um combustível renovável, não contribuindo, portanto com o acúmulo de CO₂ na atmosfera, a utilização do etanol no Brasil depende dos ganhos econômicos que este proporciona para os proprietários dos veículos.

Basicamente o processo de fermentação contínua é constituído de tanques agitados ligados em série. Possui unidade separadora que permitem o reciclo de células de leveduras, mantendo a concentração destas elevada, o que proporciona obter altas produtividades. Estas unidades separadoras, constituídas de máquinas centrífugas, são responsáveis por aproximadamente 20% dos custos industriais da produção de etanol, que na safra de 1998 atingiu valores próximos a R\$ 0,16/litro. Portanto, processos que permitam a operação com altas concentrações de células que não necessitem destes equipamentos permitiriam uma diminuição significativa dos custos de produção deste combustível.

Alguns processos, utilizando células de leveduras com características floculantes e decantadores como unidade de separação foram instalados em unidades industriais sem atingirem o desempenho esperado principalmente por falhas de projeto ou utilização de cepas de leveduras não adequadas as condições operacionais das destilarias brasileiras. A separação de células de levedura por decantação também contribui para o baixo desempenho destes processos, pois se trata de uma operação lenta, levando em alguns casos, até duas horas para realizar o que as separadoras centrífugas realizam em alguns segundos.

A utilização de reatores que permitam a retenção das células de leveduras em seu interior elimina a necessidade da unidade de separação e permitem operar o processo com altas concentrações de células (45 % v/v) e consequentemente altas produtividades. A utilização de concentrações celulares deste nível em sistemas que fazem uso de separadoras centrífugas não é uma prática economicamente viável uma vez que se faz necessário um

elevado número dessas máquinas para realização da concentração de células, obtendo, portanto menor produtividade que os anteriores.

Segundo VIEGAS (2002) é possível operar reatores tipo torre com altas produtividades e elevados rendimentos sem a necessidade de se utilizar unidade de separação de células (centrífugas). Dados deste mesmo trabalho mostram que a maior dificuldade de operação destes reatores é a manutenção da estabilidade do leito de células formado no primeiro reator para altas taxas de aplicação de substrato (g de substrato/ h). Este fato se deve a grande quantidade de CO₂ produzido em função da alta velocidade de fermentação alcançados nestas condições, o que causa uma fluidização excessiva do leito, arrastando as células para o segundo reator.

Com base nestes dados e buscando evitar a necessidade de instalação de unidades de separação de células, o objetivo deste trabalho foi estudar diferentes arranjos de reatores buscando otimizar operacionalmente a estabilidade do leito de células formado na fermentação para produção de etanol. Nesta etapa foram testados três arranjos constituídos cada um por três reatores, onde se buscou atingir altas produtividades mantendo o rendimento em etanol compatível aos níveis industriais, sem a necessidade de se utilizar unidade de separação de células.

Após a obtenção do arranjo ótimo, foi estudado o desempenho do mesmo com diferentes meios industriais (méis de Usina de Açúcar com diferentes graus de esgotamento e resíduos açucarados proveniente da última prensagem do bagaço de laranja da fábrica de suco concentrado).

Parâmetros cinéticos foram ajustados a partir de dados obtidos experimentalmente utilizando-se um programa desenvolvido em DELPHI 5.0 para que através de simulação em computador, a dinâmica do processo pudesse ser melhor compreendida o que permitirá o desenvolvimento de uma estratégia de controle confiável para posterior aplicação industrial do processo proposto.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J.R. Processo de recuperação de levedura ou processo Melle-Boinott. In: SEMANA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, 1, Piracicaba. Anais. p. 254-262, 1960.
- ANDRIETTA, S.R. Modelagem, Simulação e Controle de Fermentação Alcoólica contínua em Escala Industrial. Campinas: FEA, UNICAMP, 1994. Tese (Doutorado)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1994.
- BORZANI, W. Fermentação alcoólica contínua. In: SEMANA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, 1., Piracicaba, 1960. Anais. p.263-276, 1960.
- BU'LOCK, J.D. Pratical advantages of very flocculent yeast for alcohol production in single and multiple continuous systems. Int. Spec. Symp. Yeast. England, v.8, A .186, 1983.
- CYSEWSKY, G. R.; WILKE, C. R. Process design and economic studies of alternative methods for the production of ethanol. Biotechnol. Bioeng., v.20, n.9, p.1421-1444, 1978.
- DREWS, W. A. fermentação do melaço de cana de açúcar no Brasil. In: SIMPÓSIO DE FERMENTAÇÃO, 1., São Paulo, Anais. p.213-222, 1964.
- FINGUERUT, J.; CÉSAR, A. R. P.; LEINER, K. H.; VAZ ROSSEL, C. E. Fermentação contínua em múltiplos estágios. STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos, 10 (3): 41-42, 1992.
- GHOSE, T. K.; THYAGI, R. D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolisate I. Batch versus continuous systems. Biotechnol. Bioeng.; v.21, n.8, p.1387-1400, 1979.
- GUERREIRO, M.A. Desenvolvimento de um sistema especialista para o projeto de unidades industriais de produção de álcool. Tese de Mestrado, UNICAMP, 1995.
- LIMA, U.A. Sistema de fermentação alcoólica. In: SEMANA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, 1, Piracicaba,. Anais. p.242-253, 1960.

- MAIORELLA, B.L., BLANCH, H. W., WILKE, C. R. Economic evaluation of alternative ethanol fermentation processes. Biotechnol. Bioeng., v.26, n.9, p.1003-1025, 1984.
- PAIVA, T.C.B., SATO, S., VISCONTI, A.E.S., CASTRO, L.A.B. Continuous alcoholic fermentation process in a tower with recycling of flocculating yeast. Applied Biochemistry and Biotechnology. v.57, n.58, p.535-541, 1996.
- VIEGAS, M.C.; ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; Use of tower reactors for continuous ethanol production, Brazilian Journal of Chemical Engineering. v.19, n.02, pp.167-173,2002.
- ZARPELLON, F.; ANDRIETTA, S. R. Fermentação contínua para produção de álcool. STAB Açúcar, Alcool e Subprodutos, 10 (4): 23-28, 1992.

CAPÍTULO 2

SELEÇÃO DA CEPA A SER UTILIZADA NO SISTEMA DE REATORES

ÍNDICE

<u>OBJETIVO</u>	13
<u>1 INTRODUÇÃO</u>	13
<u>1.1 Fatores que Influenciam na Floculação de Leveduras</u>	13
<u>2 MATERIAIS E MÉTODOS</u>	14
<u>2.1 Descrição do Sistema de Diluição em Linha</u>	14
<u>2.2 Substrato Concentrado</u>	15
<u>2.3 Descrição dos reatores</u>	16
<u>2.4 Seleção de cepas a serem utilizadas no sistema</u>	16
<u>2.4.1 Seleção através da dinâmica populacional em fermentador de bancada</u>	16
<u>2.4.1.1 Microrganismos</u>	16
<u>2.4.1.2 Inóculo</u>	17
<u>2.4.1.3 Avaliação da Capacidade Fermentativa (CF)</u>	17
<u>2.4.1.4 Velocidade Específica de Sedimentação (VES)</u>	17
<u>2.4.1.5 Determinação da taxa específica de crescimento celular</u>	18
<u>2.4.1.5.1 Cálculo da taxa específica de crescimento celular</u>	18
<u>2.4.1.6 Crescimento e Retenção de Células no Sistema de Fermentadores</u>	19
<u>2.4.1.7 Condução dos Ensaios da Seleção de Cepas através da dinâmica Populacional</u>	19
<u>2.4.2 Testes das Cepas Formadoras de “Pellets” no Sistema de Fermentadores</u>	20
<u>2.4.2.1 Microrganismo</u>	20
<u>2.4.2.2 Inóculo</u>	21
<u>2.4.2.3 Condução dos Ensaios</u>	21
<u>2.5 Métodos Analíticos</u>	22
<u>2.5.1 Determinação de Glicose, Frutose, Sacarose, Glicerol e Etanol</u>	22
<u>2.5.2 Determinação do Brix Refratométrico (% de sólidos solúveis p/p)</u>	22
<u>2.5.3 Contagem de leveduras</u>	22
<u>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	23
<u>3.1 Seleção através da dinâmica populacional em fermentador de bancada</u>	23
<u>3.2 Testes das Cepas Formadoras de “Pellets” no Sistema de Reatores</u>	26

<u>4</u>	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>31</u>
-----------------	--	------------------

OBJETIVO

Neste capítulo será selecionada a cepa a ser utilizada nos ensaios de otimização operacional do sistema de reatores. A cepa a ser utilizada nos ensaios de bancada foi selecionada dentre outras 15 cepas isoladas de processos de fermentação alcoólica industriais.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fatores que Influenciam na Floculação de Leveduras

Em indústrias de alimentos ou de biotecnologia onde células são empregadas em reatores, normalmente se faz necessário numa etapa subsequente a separação das células em suspensão do meio fermentativo. A produção de etanol é um típico exemplo destes processos. A utilização de reatores que operam com leveduras floculantes (autoimobilizáveis) permite a retenção das células de leveduras em seu interior eliminando a necessidade da unidade de separação permitindo operar o processo com altas concentrações de células (45 % v/v) e consequentemente altas produtividades (VIEGAS, 1999).

A busca do entendimento do mecanismo da floculação em células de leveduras tem sido objeto de estudo de vários grupos de pesquisadores. Segundo JIN & SPEERS, 1998 até a década de 60 muitos estudaram o efeito das condições do meio tais como: concentração de sais, açúcares, etanol, pH, temperatura, oxigênio dissolvido e proteólises no mecanismo de floculação de leveduras. Após a década de 70 estudos genéticos tem auxiliado na compreensão dos mecanismos que influenciam a floculação à nível molecular.

SPEERS & RITCEY, 1995 através da teoria coloidal básica, notou a importância da tensão superficial na taxa de floculação. De acordo com SPEERS & RITCEY, 1995 a estrutura do floco de levedura é determinado por um número de fatores microbiológicos e físico-químicos, dentre eles o mais importante é a taxa de cisalhamento que tem influência na viscosidade do meio onde as células se encontram em suspensão.

De acordo com JIN & SPEERS, 1998 o efeito de íons no meio, particularmente íons cálcio e magnésio estão diretamente relacionados ao mecanismo de floculação das leveduras.

O efeito do etanol e outros álcoois têm sido relatados por alguns autores, dentre eles AMORY *et. al.*, 1988 por promover a floculação em células de leveduras. Considerando as células de leveduras como um colóide hidrofóbico o efeito do etanol é resultante da adsorção na superfície celular, o que pode causar a redução da constante dielétrica e redução da repulsão eletrostática entre as células. Da mesma forma solventes orgânicos podem então promover as interações entre as células (DENGIS *et. al.*, 1995).

Segundo JIN & SPEERS, 1998 a hidrofobicidade da parede celular tem sido identificada como um fator importante responsável pelo efeito da floculação em leveduras de panificação.

De acordo com STRATFORD, 1996 as células de leveduras se agregam devido à força de Van der Waals, onde na ausência de outro tipo de força atrativa, estas são importantes para que as células de leveduras superem as forças de repulsão eletrostáticas promovendo então a floculação das mesmas.

Segundo LUDWIG *et. al.*, 2001 fatores protéicos associados a sais minerais e às mananas estão envolvidos na floculação de leveduras e a ação de proteases é eficaz na desfloculação do fermento. Para que a floculação se desenvolva é necessária a presença de íons cálcio e também a movimentação entre as células, para que se acelere o processo de floculação, provavelmente devido ao aumento de colisão entre as células, facilitando a adesão.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Descrição do Sistema de Diluição em Linha

Com o objetivo de realizar os testes em bancada em condições o mais próximo possível de uma planta industrial, foi desenvolvido um sistema de preparo de substrato de alimentação através de diluição em linha de uma solução mais concentrada, eliminando-se assim a necessidade de se esterilizar o meio de fermentação, o substrato diluído possui um

tempo de retenção de no máximo 10 minutos no sistema de diluição o que não possibilita uma alta taxa de contaminação na alimentação do sistema de fermentadores.

Este sistema é formado por duas bombas peristálticas ligadas diretamente aos frascos contendo água e a solução concentrada de substrato. A vazão de cada bomba é calculada dependendo da concentração de substrato e da vazão desejada para a alimentação dos reatores. A Figura 2.1 mostra o esquema de diluição em linha.

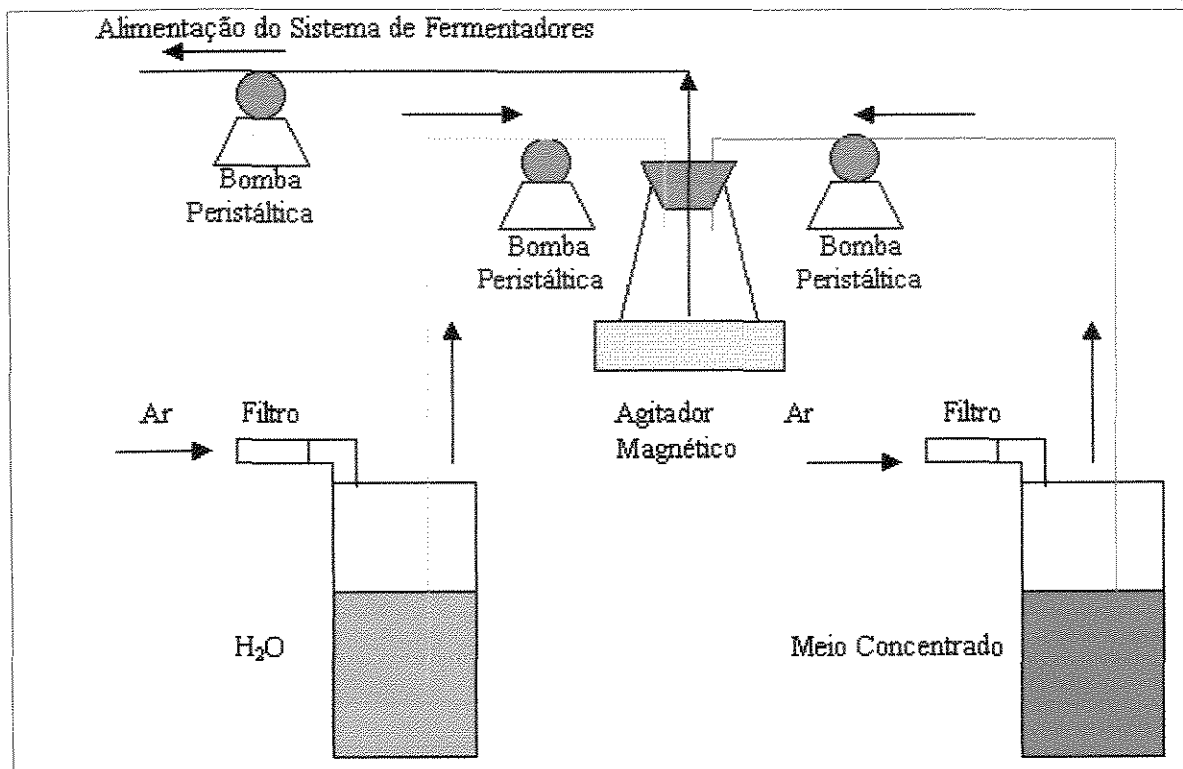


Figura 2.1- Sistema de diluição em linha do meio fermentativo que alimentará os fermentadores

2.2 Substrato Concentrado

O substrato utilizado na alimentação do sistema piloto nos ensaios realizados foi um meio sintético concentrado diluído em linha conforme descrito no item 2.1, utilizando como fonte de carbono a sacarose (concentração de 70 % p/p em Brix) adicionada de: Fosfato diácido de potássio 25,0 g/L; Cloreto de amônio 25,0 g/L; Sulfato de magnésio heptaidrato 5,0 g/L; Cloreto de potássio 5,0 g/L; Extrato de levedo 30,0 g/L.

2.3 Descrição dos reatores

Foram utilizados reatores de bancada de capacidade de 1,4 litros, construídos a partir de um projeto baseado em experiências industriais e princípios básicos de engenharia. Os mesmos foram confeccionados em vidro em forma de torre (5,8 cm diâmetro e 61 cm de altura), dotados de uma camisa para controle da temperatura. A temperatura dos reatores foi mantida constante por meio de circulação de água a 32°C pela camisa do mesmo. A alimentação do substrato foi feita através de bomba peristáltica ligada diretamente ao sistema diluidor. Esse substrato foi alimentado pelo fundo dos fermentadores e o vinho fermentado retirado lateralmente pela parte superior. Os fermentadores possuem ainda na parte superior uma saída para exaustão do CO₂.

2.4 Seleção de cepas a serem utilizadas no sistema

2.4.1 Seleção através da dinâmica populacional em fermentador de bancada

Este ensaio teve como objetivo acompanhar a dinâmica populacional de seis cepas de leveduras, selecionadas dentre quinze cepas com características floculantes isoladas de processos industriais. Durante quinze dias, populações de levedura foram quantificadas por contagem de colônias sobre um meio diferencial (WLN). Neste meio, seis leveduras testadas foram diferenciadas por apresentarem colônias de padrões morfológicos distintos entre si.

2.4.1.1 Microrganismos

Foram testadas seis diferentes linhagens de leveduras com características floculantes, selecionadas dentre quinze outras isoladas industrialmente. Esta seleção foi realizada principalmente em função de sua capacidade de floculação, uma vez que essa característica é o principal requisito para manutenção da linhagem imobilizada no reator. Essas foram isoladas de processos industriais de fermentação alcoólica (Y1 e Y3 – Destilaria Diana – Avanhadava – SP - safra 1995; Y2 – Usina Costa Pinto – Piracicaba – SP - safra 1998; Y4 - Usina Junqueira – Igarapava – SP – safra 2000; e Y5 e Y6 – Usina Costa Pinto – Piracicaba – SP safra 1999) e apresentaram desempenho fermentativo adequado para processos industriais.

2.4.1.2 Inóculo

O Inóculo utilizado foi preparado em Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio esterilizado (15 minutos/121°C) composto de: Sacarose 150 g/L, Fosfato diácido de potássio 5,0 g/L; Cloreto de amônio 5,0 g/L; Sulfato de magnésio heptaidrato 1,0 g/L; Cloreto de potássio 1,0 g/L; Extrato de levedo 6,0 g/L. As seis cepas descritas no item 2.4.1.1 foram crescidas isoladamente em “slants” de PDA (Potato Dextrose Agar) por 24 h a 32°C e ressuspendidas em água esterilizada e inoculadas em concentração de 10% do volume total do meio fermentativo.

Os frascos foram incubados em “shaker” por 24 h a 32°C a uma rotação de 150 rpm. O fermentado foi alimentado ao sistema de fermentação através de bomba peristáltica. Foram feitos quatro frascos para cada uma das linhagens testadas. As leveduras foram misturadas em um só frasco para a obtenção do inóculo final que inoculou os fermentadores.

2.4.1.3 Avaliação da Capacidade Fermentativa (CF)

A capacidade fermentativa das cepas testadas nesta etapa foi avaliada segundo a técnica do potencial fermentativo (ANDRIETTA *et al.* 1995) que se baseia na determinação de parâmetros cinéticos (velocidade específica máxima de crescimento) e de parâmetros de produção específica (etanol e massa celular). As produções específicas foram obtidas em função do açúcar consumido. Os valores de produções específicas foram comparados aos obtidos por uma cepa de referência (potencial fermentativo igual a zero), que possui um comportamento médio e satisfatório entre as utilizadas nas destilarias brasileiras.

2.4.1.4 Velocidade Específica de Sedimentação (VES)

As cepas foram cultivadas por 24 horas a 32°C e 150rpm, em frascos Erlenmayer de 250 mL contendo 100 mL de meio sintético: (g/L): glicose, 150,0; KH_2PO_4 , 5,0; NH_4Cl , 1,0 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0; KCl , 1,0; extrato de levedura, 6,0. Aliquotas de 40mL do vinho fermentado foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos. A massa de células precipitada foi ressuspensa em água destilada e recentrifugada por duas vezes. Um grama do

precipitado final foi diluído em 100mL de água e, após agitação intensa, a densidade óptica foi acompanhada durante 10 minutos, em intervalos de 30 segundos a um comprimento de onda de 600nm.

A velocidade específica de sedimentação (VES) é representada matematicamente pela equação (2.1) (VIEGAS, 1999).

$$VES = \left(\frac{1 - \frac{Abs_t}{Abs_0}}{t - t_0} \right) \quad (2.1)$$

Onde: Abs₀ - valor da absorbância medido no tempo inicial t₀

Abs_t - valor da absorbância medido no tempo t

2.4.1.5 Determinação da taxa específica de crescimento celular

Foram preparados Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultivo estéril composto de: Glicose 40 g/L; Fosfato diácido de potássio 5,0 g/L; Cloreto de amônio 5,0 g/L; Sulfato de magnésio heptaidrato 1,0 g/L; Cloreto de potássio 1,0 g/L; Extrato de levedo 6,0 g/L. Inoculou-se os frascos seguindo o mesmo procedimento descrito no item 2.4.1.2. Imediatamente após a inoculação, retirou-se uma amostra para a leitura da absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda de $\lambda=600$ nm e os frascos foram incubados em “shaker” a uma temperatura de 32°C /150 rpm. Amostras foram retiradas e lidas no espectrofotômetro de hora em hora nas 03 primeiras horas de incubação. A partir da terceira hora as amostras foram retiradas de meia em meia hora. Os ensaios foram conduzidos até o final da fase exponencial de crescimento caracterizado pela leitura constante da absorbância.

2.4.1.5.1 Cálculo da taxa específica de crescimento celular

Sabe-se, experimentalmente, que o aumento da população está relacionado com a quantidade populacional e uma constante de proporcionalidade μ (taxa específica de crescimento), esta relação é descrita matematicamente pela equação (2.2).

$$\frac{dX}{dt} = \mu^* X \quad (2.2)$$

Onde: X-Concentração celular (g/L)

t- tempo (h)

Integrando-se a equação 2.2, obtém-se a equação (2.3).

$$\int_0^t \mu^* dt = \int_X^{X_0} \frac{dX}{X} \quad (2.3)$$

Assumindo-se que μ é constante e igual a μ máx na fase exponencial, da integração da equação (2.3) obtém a equação (2.4).

$$\mu_{\text{máx}} * t = \ln \frac{X}{X_0} \quad (2.4)$$

A equação (2.4) é similar a equação de uma reta ($y = a + b * x$), portanto plotando-se $\ln X/X_0$ em função do tempo obtém-se por regressão linear o coeficiente angular da reta, obtendo-se assim o valor de $b = \mu_{\text{máx}}$.

2.4.1.6 Crescimento e Retenção de Células no Sistema de Fermentadores

Após a inoculação do reator, deu-se início a fase de retenção e acúmulo de células de leveduras dentro do mesmo, alimentando-se continuamente o reator com meio sintético concentrado (item 2.2) proveniente do diluidor em linha conforme descrito no item 2.1. A concentração de substrato utilizada nesta fase foi de 125 g/L e sua duração foi de seis dias, até que se obteve uma concentração de células constante e satisfatória para operar o processo (45 % v/v).

2.4.1.7 Condução dos Ensaio da Seleção de Cepas através da dinâmica Populacional

O inóculo obtido conforme descrito no item 2.4.1.2 foi adicionado em quantidades iguais aos dois fermentadores ligados em série por auxílio de bomba peristáltica. Após a fase

inicial de crescimento celular, a alimentação do meio foi iniciada a uma concentração de substrato de 150 g/L proveniente do sistema diluidor à uma vazão constante de 10 mL/minuto na entrada do primeiro reator. Amostras foram retiradas dos dois fermentadores nos tempos 1, 2, 3, 4, 6, 8, 11, 13 e 15 dias. As análises realizadas foram: etanol, sacarose, frutose, glicose, glicerol e contagem de leveduras. Uma amostra do inóculo antes de se iniciar a alimentação do reator foi retirada para quantificar cada uma das leveduras introduzidas inicialmente.

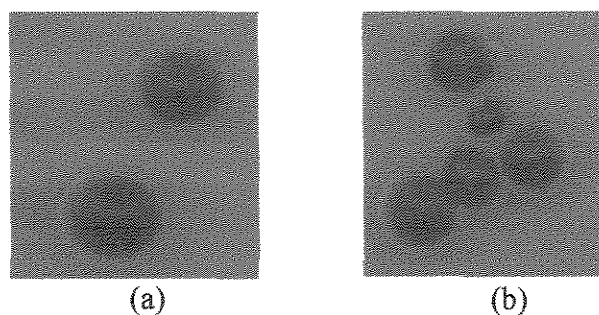
2.4.2 Testes das Cepas Formadoras de “Pellets” no Sistema de Fermentadores

A partir dos resultados obtidos no item 2.4.1 optou-se por fazer a seleção da cepa a ser utilizada nos ensaios de bancada, utilizando-se um teste em shaker. Selecionou-se dentre quinze cepas com características floculantes isoladas industrialmente, quatro cepas que formaram “pellets” visíveis após 24 horas de fermentação em shaker a 32°C e 150 rpm. Estas quatro cepas foram testadas isoladamente no sistema de fermentadores, onde foi monitorado ao longo de cada fermentação: (a) produção de etanol, (b) consumo de ART e (c) altura e estabilidade do leito formado por cada cepa testada.

2.4.2.1 Microrganismo

Foram testadas quatro diferentes linhagens de leveduras com características floculantes, selecionadas dentre quinze outras isoladas industrialmente. Essas foram isoladas de processos de fermentação alcoólica (Y1 Usina Costa Pinto – Piracicaba /SP safra 1999; Y2 – Destilaria Diana /Avanhadava – SP - safra 1995; Y3 e Y4 - Usina Junqueira /Igarapava /SP – safra 2000) e apresentaram desempenho fermentativo adequado para utilização em processos industriais.

A cepa Y1 (Usina Costa Pinto - safra 1999) é a mesma cepa Y5 (descrita no item 2.4.1.1). A cepa Y4 (Usina Junqueira – Igarapava /SP – safra 2000) não havia sido incluída dentre as cepas descritas no item 2.4.1.1, uma vez que esta apresenta características morfológicas em placas com meio WLN idênticas a cepa Y1 (Usina Costa Pinto - safra 1999), conforme pode ser observado pelas Figuras 2.2.a e 2.2.b.



Figuras 2.2.a e 2.2.b – Foto de Leveduras Floculantes plaqueadas em WLN: (a) Cepa Y1 (Usina Costa Pinto - safra 1999) e (b) Cepa Y4 (Usina Junqueira - safra 2000)

2.4.2.2 Inóculo

As quatro cepas crescidas em PDA (Potato Dextrose Agar) foram incubadas separadamente em shaker por 24 h, 32 °C e 150 rpm em Erlenmayer de 250 mL contendo 100 mL de meio fermentativo. O vinho fermentado foi inoculado nos reatores através de bomba peristáltica conforme descrito no item 2.4.1.2.

2.4.2.3 Condução dos Ensaios

Nesta fase foi testada cada cepa isoladamente em um único reator, uma vez que o objetivo destes ensaios era testar as quatro cepas selecionadas isoladamente. O inóculo foi adicionado pelo fundo do reator por auxílio de bomba peristáltica. Após a fase inicial de crescimento celular, a alimentação do substrato proveniente do sistema diluidor (item 2.1) foi iniciada a uma vazão de 8 mL/minuto e uma concentração de substrato de 150,00 g/L, sendo mudada posteriormente as vazões para 10 e 12 mL/minuto após o estágio estacionário de cada vazão ter sido atingido, mantendo-se a concentração de substrato constante.

Amostras foram retiradas em 3 pontos distintos com alturas conhecidas (7, 25 e 61 cm), onde foi monitorado em cada amostragem: (a) produção de etanol, (b) consumo de ART e (c) altura e estabilidade do leito formado por cada cepa testada.

A partir dos resultados experimentais traçou-se o perfil de consumo de substrato e produção de etanol em função do comprimento do fermentador para cada cepa testada. Além disto, os resultados obtidos foram utilizados para comparar o comportamento do leito

de células formado pelas três novas cepas com a daquela utilizada em testes realizados anteriormente por VIEGAS (1999).

2.5 Métodos Analíticos

2.5.1 Determinação de Glicose, Frutose, Sacarose, Glicerol e Etanol

As análises para determinação de glicose, frutose, sacarose, etanol e glicerol presentes no vinho fermentado centrifugado e no mosto foram feitas utilizando-se cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC - Waters) cujas condições são descritas abaixo:

- Eluente – Ácido Sulfúrico (0,1 N) a vazão de 0,5 mL/min.
- Coluna – Metacarb 87H (300 x 7,8 mm)
- Volume de injeção – 25 µL.
- Temperatura da Coluna – 35°C.
- Detector – Índice de refração (Waters Modelo 401)
- Padrões utilizados – Sigma.

2.5.2 Determinação do Brix Refratométrico (% de sólidos solúveis p/p)

Utilizou-se refratômetro ótico (Marca: American Optical ABBE Refractometer). Diluições (p/p) foram realizadas quando necessário.

2.5.3 Contagem de leveduras

As amostras retiradas dos dois fermentadores foram submetidas à diluição em série. As diluições de 10^{-4} a 10^{-7} foram plaqueadas na superfície em meio WLN. A diferenciação das linhagens foi feita em função da diferenciação morfológica das colônias no meio utilizada. Essa diferenciação inclui tamanho e perfil de coloração.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção através da dinâmica populacional em fermentador de bancada

A Tabela 2.1 mostra os resultados obtidos do potencial fermentativo, velocidade específica de crescimento (h^{-1}) e velocidade específica de sedimentação para cada cepa testada.

Tabela 2.1 - PF - Potencial Fermentativo; $\mu_{\text{máx}}$ -Velocidade Específica Máxima de crescimento (h^{-1}) e VES - Velocidade Específica de Sedimentação (min^{-1}) das cepas testadas na etapa de seleção através da dinâmica populacional em fermentadores de bancada.

Cepa	PF	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	VÊS (min^{-1})
Y 1	94,90	0,57	0,16
Y2	300,00	0,51	0,14
Y 3	112,40	0,49	0,01
Y 4	72,20	0,50	0,26
Y 5	13,80	0,52	0,15
Y6	300,00	0,51	0,01

Pela Tabela 2.1 pode-se perceber que no que diz respeito ao desempenho fermentativo das cepas utilizadas nos fermentadores, os resultados obtidos para o potencial fermentativo forneceu dados suficientes para afirmar que todas as cepas possuíam as características necessárias para permanecer no sistema. Os valores obtidos para o potencial fermentativo (produções específicas de etanol e massa celular) e a velocidade específica máxima de crescimento para todas as cepas coincidem com os que ANDRIETTA *et al.*, (1995) consideram dentro dos valores médios obtidos para as cepas utilizadas em processos industriais.

As Figuras 2.3 e 2.4 mostram os resultados da dinâmica populacional em função dos dias de ensaio para os reatores 01 e 02 respectivamente.

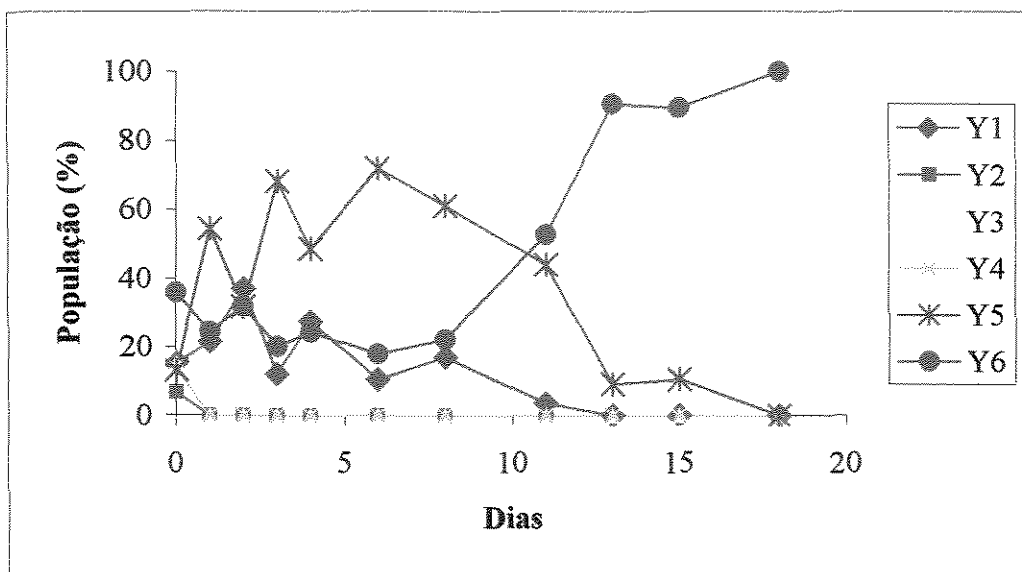


Figura 2.3- Dinâmica populacional das cepas de leveduras: Y1 e Y3 – Destilaria Diana – Avanhadava/SP - safra 1995; Y2 – Usina Costa Pinto – Piracicaba/SP - safra 1998; Y4 - Usina Junqueira – Igarapava/SP – safra 2000; e Y5 e Y6 – Usina Costa Pinto – Piracicaba/SP safra 1999 (Reator 1)

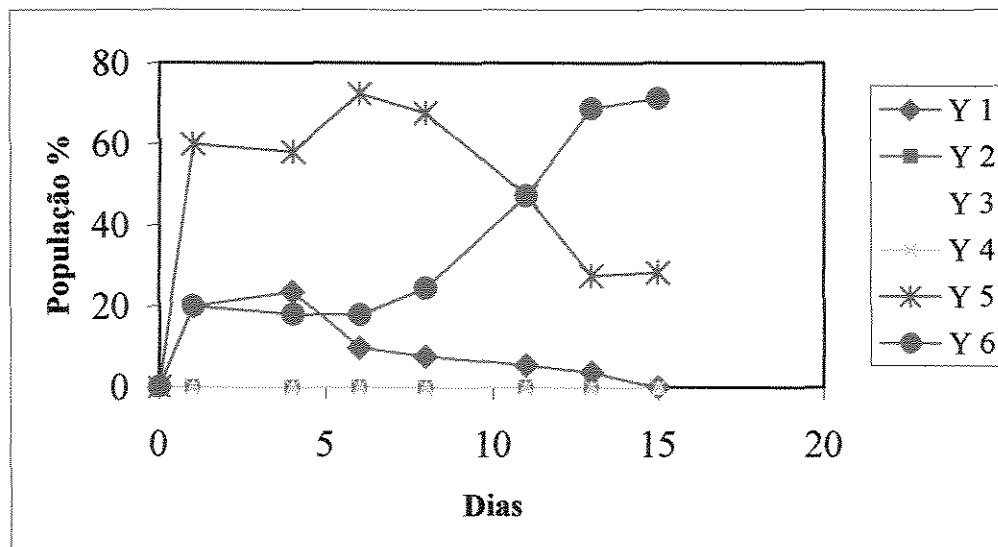


Figura 2.4- Dinâmica populacional das cepas de leveduras: Y1 e Y3 – Destilaria Diana – Avanhadava/SP - safra 1995; Y2 – Usina Costa Pinto – Piracicaba/SP - safra 1998; Y4 - Usina Junqueira – Igarapava/SP – safra 2000; e Y5 e Y6 – Usina Costa Pinto – Piracicaba/SP safra 1999 (Reator 2)

A partir dos dados apresentados nas Figuras 2.3 e 2.4 pode-se perceber que existiu uma seleção espontânea dentro dos reatores, uma vez que no final do ensaio apenas duas (Y5 e Y6) das seis cepas inoculadas inicialmente foram encontradas no processo. Esperava-se com este ensaio que o próprio sistema selecionasse uma levedura com produção específica de etanol ($Y_{p/s}$) compatível com os níveis industriais e ao mesmo tempo mantivesse a estabilidade do leito mesmo quando fossem aplicadas altas taxas de aplicação de substrato (g de substrato/ hora).

Os resultados contidos nas Figuras 2.3 e 2.4 mostram que após 24 horas de ensaio as cepas Y2, Y3 e Y4 não estavam presentes nos dois fermentadores, na menor concentração avaliada ($<10^5$). No reator 1 houve um domínio inicial da cepa Y5, após o sexto dia foi observada a predominância da cepa Y6, fenômeno este que se manteve até o final do ensaio (15 dias). Esta mesma tendência repetiu-se para o segundo reator.

Não foi possível associar o parâmetro velocidade de sedimentação (VES) com a dominância da cepa Y6 no processo. Esperava-se que a cepa dominante fosse a Y4, uma vez que essa apresentou a maior uma velocidade de sedimentação ($0,26 \text{ min}^{-1}$). Entretanto a cepa Y6, que apresentou uma velocidade de sedimentação baixa ($0,015 \text{ min}^{-1}$), foi a que dominou o processo.

Um ponto importante a ser considerado diz respeito ao teste utilizado para avaliação da floculação (velocidade específica de sedimentação). Embora todas as cepas sejam floculantes, foi observada uma diferença no padrão de floculação. Essas diferenças foram observadas quando as leveduras cresceram isoladas em “shaker” para obtenção do inóculo. As células da cepa Y6, embora floculada, se mantém em suspensão por um espaço maior de tempo. Desta forma o teste de velocidade de sedimentação não forneceu dados esclarecedores no estudo em questão.

O leito formado no interior dos reatores se mostrou estável até o 10º dia, período este que o sistema foi dominado pela cepa Y5. Após este período observou-se a redução drástica do leito formado e conseqüentemente da concentração celular no interior dos reatores, onde o leito formado começou a desaparecer, período este marcado pela diminuição populacional da cepa Y5 e aumento da Y6 (Figuras 2.3 e 2.4).

Por este motivo optou-se por fazer um novo estudo de seleção com as cepas que apresentaram formação de “pellets” para avaliação de estabilidade das mesmas, uma vez que a cepa Y6 que dominou o processo não apresentou a formação de um leito estável, fator este essencial para que a cepa possa ser utilizada na operação do sistema proposto em testes de bancada e posteriormente em escala piloto.

3.2 Testes das Cepas Formadoras de “Pellets” no Sistema de Reatores

A Tabela 2.2 mostra os resultados obtidos para cada cepa nas três vazões testadas conforme descrito procedimento descrito no item 2.4.2.3.

Tabela 2.2- Concentrações de Etanol e ART em Função do Comprimento do Reator – testes de seleção das cepas.

Cepa	Altura (cm)	ART (g/L) Vazão de Alimentação (mL/min)			Etanol (°GL) Vazão de Alimentação (mL/min)		
		8	10	12	8	10	12
Cepa Y1 - Usina Costa Pinto (Piracicaba/SP)	0	173,6	122,31	106,12	0	0	0
	7	64,51	25,11	44,27	3,984	3,5426	3,1256
	25	24,34	18,51	28,64	6,7798	4,597	4,033
	61	10,51	9,1	12,96	7,2458	5,578	5,431
		8	10	12	8	10	12
Y2 – Destilaria Diana (Avanhandava/SP)	0	153,14	139,55	120,57	0	0	0
	7	53,04	55,46	53,43	3,54	4,38	2,12
	25	39,67	34,8	38	3,69	4,8	3,74
	61	17,9	19,2	36,7	4,4	5	4,45
		8	10	12	8	10	12
Y3 – Usina Junqueira (Cepa 2/00) (Igarapava/SP)	0	156,26	139,55	120,57	0	0	0
	7	44,04	42,21	37,92	3,71	5,52	3,64
	25	16	27	17,29	6,02	6,04	5,52
	61	11,3	16,4	12,9	7,05	7,04	6,84
		8	10	12	8	10	12
Y4 – Usina Junqueira (Cepa 4/00) (Igarapava/SP)	0	151,41	132,73	94,92	0	0	0
	7	65,36	70,42	48,21	3,1502	3,2482	2,9786
	25	13,02	26,17	27,83	6,5346	5,0386	3,7142
	61	12,43	8,24	15,55	6,976	6,3	5,3084
		8	10	12	8	10	12

Os resultados mostrados na Tabela 2.2 podem ser melhor visualizados pelos gráficos apresentados nas Figuras 2.5 a 2.8.

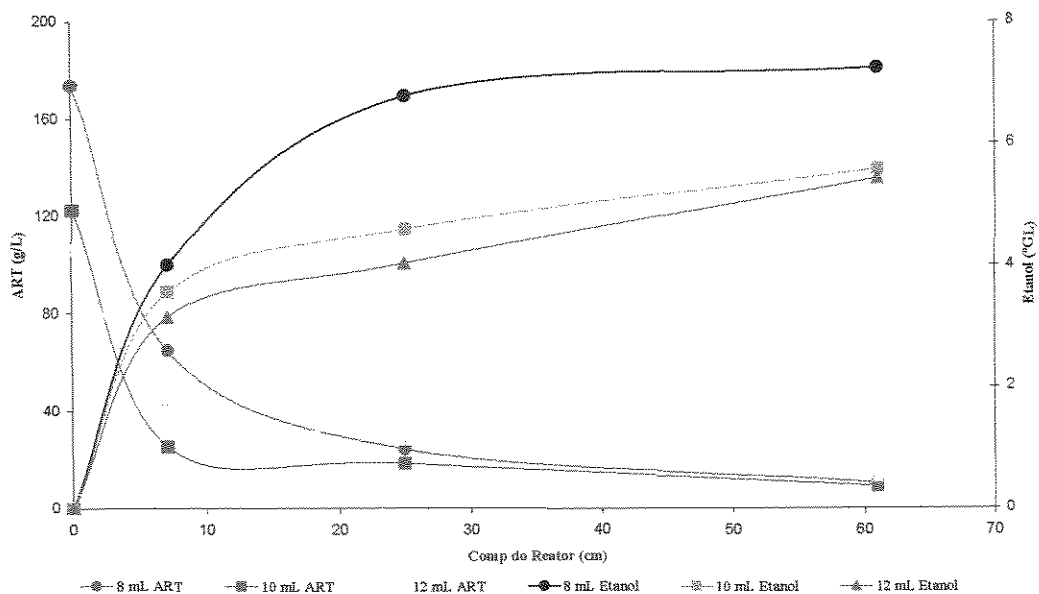


Figura 2.5 – Concentração de ART (g/L) e Etanol (°GL) em função do comprimento reator para a cepa Y1 (Usina Costa Pinto- safra 1999)

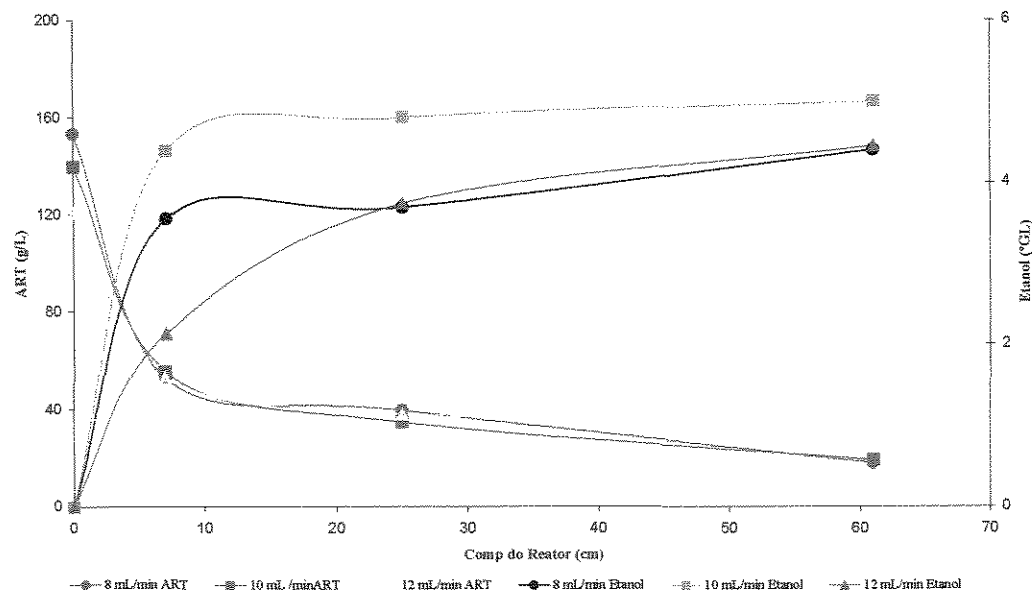


Figura 2.6 – Concentração de ART (g/L) e Etanol (°GL) em função do comprimento reator para a cepa Y2 (Destilaria Diana- safra 1995)

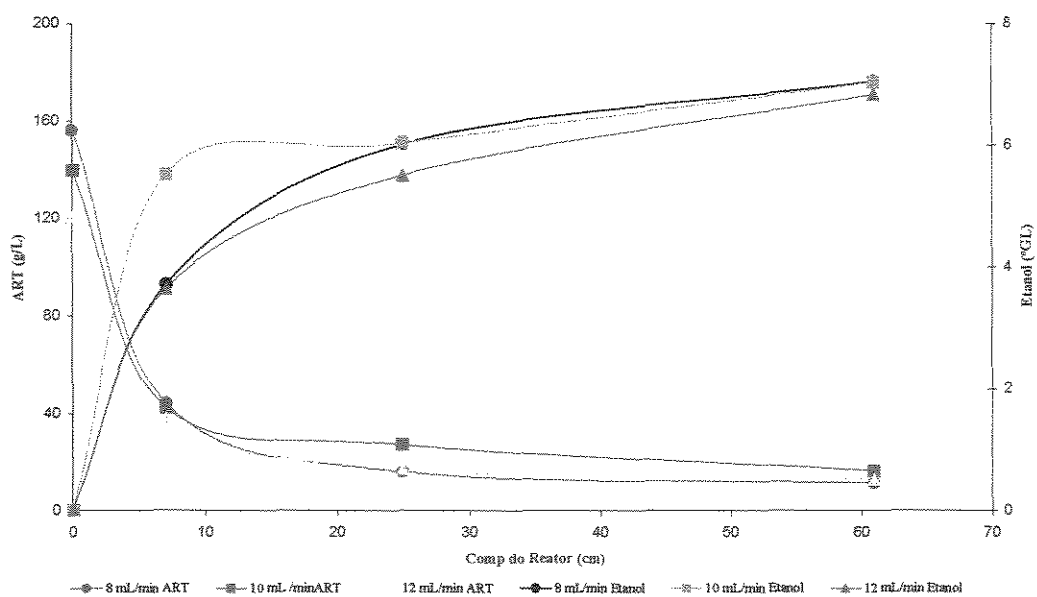


Figura 2.7 – Concentração de ART (g/L) e Etanol (°GL) em função do comprimento reator para a cepa Y3 (Destilaria Junqueira C4-safra 2000)

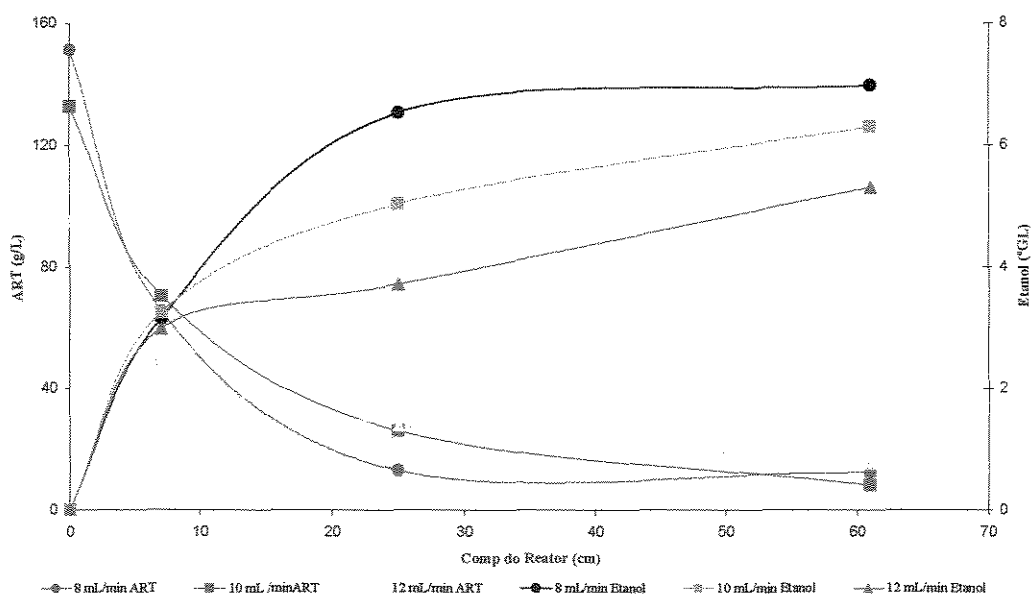


Figura 2.8 – Concentração de ART (g/L) e Etanol (°GL) em função do comprimento reator para a cepa Y4 (Destilaria Junqueira C2-safra 2000)

A Tabela 2.3 apresenta as conversões em ART e a produtividade do reator (equação 4.3 – capítulo 4) obtidas em cada tempo de residência para as quatro cepas testadas, calculadas a partir dos resultados apresentados na Tabela 2.2.

Tabela 2.3- Conversões em ART e Produtividade do Reator para as vazões os tempos de residência tr: 2,92; 2,33 e 1,94 h

Cepa	Dias de Operação (Leito Estável)	Conversões em ART (%)			Produtividade do Reator (mL Etanol/L h)		
		tr=2,92 h	tr=2,33 h	tr=1,94 h	tr=2,92 h	tr=2,33 h	tr=1,94 h
Y1	21	93.94	92.55	87.78	21.62	20.82	21.34
Y2	19	88.31	86.24	69.56	13.13	18.65	19.95
Y3	30	92.76	88.24	89.30	21.04	26.26	30.67
Y4	45	91.79	93.79	83.61	20.82	23.5	23.8

A partir dos resultados apresentados na Tabela 2.3 obteve-se as Figuras 2.9 e 2.10 que mostram respectivamente as conversões e produtividade do reator obtido para cada cepa em função da vazão de alimentação.

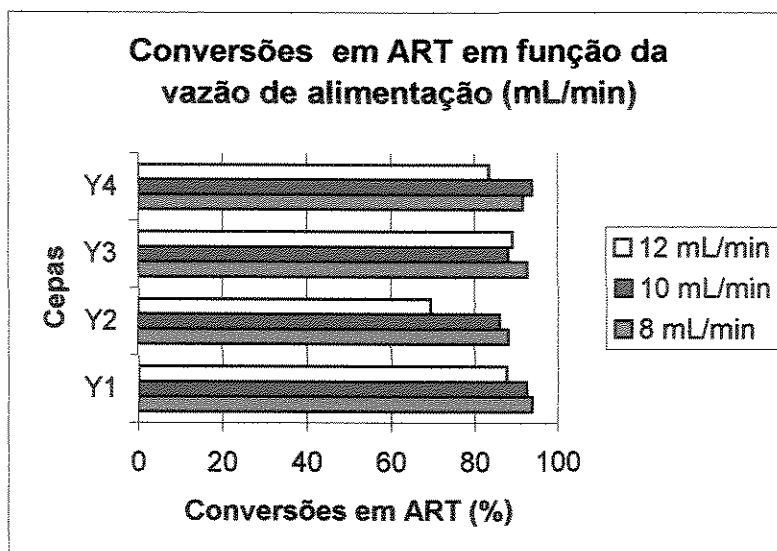


Figura 2.9- Conversões em ART em função da vazão de alimentação para as Cepas: Y1, Y2, Y3, Y4

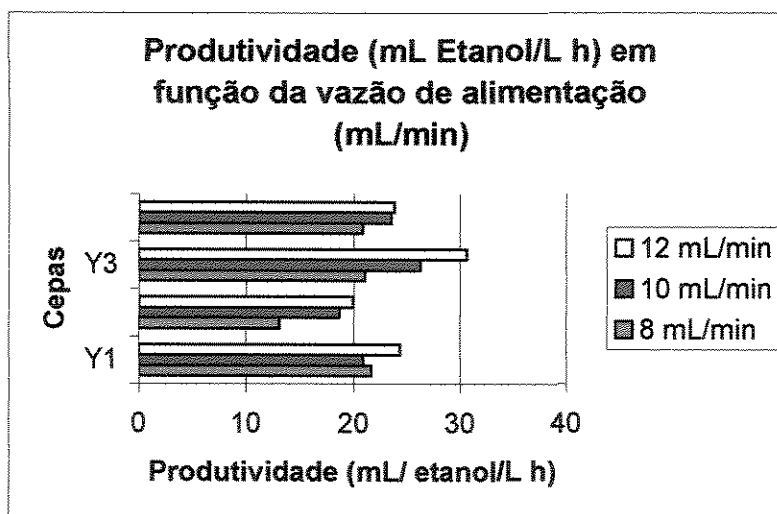


Figura 2.10- Produtividade do reator em função da vazão de alimentação para as Cepas: Y1, Y2, Y3, Y4

Como pode ser observado pelas Figuras 2.9 e 2.10, os valores das conversões de ART geralmente diminuem com o aumento da vazão de alimentação, comportamento este antagônico ao apresentado pela produtividade do reator que aumenta quando se opera o sistema com vazões mais elevadas.

Pode-se perceber pelos resultados apresentados na Tabela 2.3 que todas as cepas testadas com exceção da cepa Y2 (isolada da Destilaria Diana/SP) apresentaram valores de

produtividade elevados, e valores de conversão de ART à níveis aceitáveis mesmo em altas vazões de alimentação.

A cepa Y2 apresentou uma queda de conversão de ART principalmente quando o sistema foi submetido à altas taxas de aplicação (g substrato/h), isto se deve ao fato que a cepa Y2 não formou um leito estável ao longo do ensaio, o que ocasionou a redução da concentração celular no interior do sistema e conseqüentemente queda de conversão e rendimento em etanol quando submetidas a condições mais extremas.

Dentre as quatro cepas testadas optou-se por selecionar a cepa Y4 para operar o sistema nos testes de otimização do melhor arranjo de reatores e de matérias primas de uso industrial, uma vez que esta apresentou o leito mais estável e por maior período (45 dias corridos) dentre as cepas estudadas, mantendo os valores de conversão em ART e produtividade em etanol em níveis aceitáveis mesmo quando o sistema foi submetido a altas taxas de aplicação.

Os valores de produtividade contidos na Tabela 2.3 apresentam ganhos bastantes significativos em relação aos processos convencionais de fermentação para produção de etanol. Segundo ANDRIETTA & MAUGERI FILHO, 1994 uma unidade de fermentação contínua convencional, ou seja, que utiliza separadoras centrífugas e células de leveduras não floculantes geralmente opera com rendimento de 87% e produtividade 7,9 g Etanol/L h, quando melaço é utilizado como matéria prima.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORY, D. E., ROUXHET, P. G. ; DUFOUR, J. P. Flocculation of brewery yeast and their surface properties: chemical composition, electrostatic charge and hydrophobicity. J. Inst. Brew. 84, p.79-84, 1988.
- ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.S.; RODRIGUES, M. I. Método de caracterização de leveduras de processo utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos , v.13, n.4, p. 22-25, 1995.

- ANDRIETTA, S.R. & MAUGERI FILHO, F. Optimum desing of a continuous fermentation unit of na industrial plant alcohol production. *Advances in Bioprocess Engineering*, 1, : 47-52, 1994.
- DENGIS, P. B., NELISSEN, L. R. and ROUXHET, P. G; Mechanisms of yeast flocculation: comparison of top- and bottom-fermenting strains. *Appl. Environ. Microbiol* 61, p. 718-728, 1995.
- JIN, YU-LAI A.; SPEERS R. A. B. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Food Research International*, Vol. 31, No. 6-7, p. 421-440, 1998.
- LUDWIG, K.M., OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D.F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Jan 2001, vol.21, no.1, p.63-66.
- SPEERS, R. A.; RITCEY, L. L. Towards an ideal flocculation assay. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 53, p.174-177, 1995.
- STRATFORD, M. Yeast Flocculation: restructuring the theories in line with recent research. *Cerevisia* 21, p.38-45, 1996.
- VIEGAS, M.C. Desenvolvimento de um Reator de Bancada de Leito Fluidizado para Produção de Etanol Utilizando Linhagens de Leveduras Floculantes. Campinas: FEQ, UNICAMP, 1999. Tese (Mestrado)- Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999.

CAPÍTULO 3

AJUSTE DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

ÍNDICE

<u>OBJETIVO</u>	34
<u>1 INTRODUÇÃO</u>	34
<u>1.1 Cinética da Fermentação Alcoólica</u>	34
<u>1.1.1 Modelos cinéticos</u>	34
<u>1.2 Modelos Matemáticos Aplicados À Fermentação Contínua Utilizando Leveduras Floculantes</u>	40
<u>2 MATERIAIS E MÉTODOS</u>	42
<u>2.1 Obtenção dos Dados Experimentais Utilizados no Ajuste dos Parâmetros Cinéticos</u>	43
<u>2.1.1 Linhagem</u>	43
<u>2.1.2 Inóculo</u>	43
<u>2.1.3 Substrato de Alimentação</u>	43
<u>2.1.4 Condução dos Ensaios para Obtenção dos Dados Experimentais</u>	43
<u>2.2 Ajuste dos Parâmetros Cinéticos Considerando uma Única Fonte de Substrato (ART)</u>	44
<u>2.2.1 Modelos Cinéticos Testados</u>	44
<u>2.3 Ajuste dos Parâmetros Cinéticos Considerando duas Fontes de Substrato (Glicose e Frutose)</u>	47
<u>2.3.1 Obtenção dos Dados Experimentais</u>	47
<u>2.3.2 Modelo Cinético Testado Considerando a Presença de dois Substratos (Glicose e Frutose)</u>	47
<u>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	49
<u>3.1 Ajuste dos Parâmetros Cinéticos Considerando uma Única Fonte de Substrato (ART)</u>	49
<u>3.2 Ajuste dos Parâmetros Cinéticos considerando duas fontes de substrato (Glicose e Frutose)</u>	56
<u>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	62

OBJETIVO

Neste capítulo foi realizado o ajuste dos parâmetros cinéticos a partir de dados obtidos experimentalmente objetivando entender melhor a cinética da fermentação contínua utilizando reatores tipo torre operando com leveduras floculantes.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cinética da Fermentação Alcoólica

O objetivo básico do estudo da cinética de processos microbianos é o de quantificar a taxa de crescimento celular, consumo de substrato, formação de produtos e demais parâmetros relacionados, esse estudo permite ainda a influência de fatores externos como pH, temperatura, inibidores, etc. nestas taxas. No caso da fermentação alcoólica, estes valores são essenciais para se projetar adequadamente uma unidade industrial de produção de etanol.

BAILEY & OLLIS (1986) classificaram os modelos cinéticos em: não-estruturados e não-segregados (células tratadas como soluto monocomponente), estruturados e não-segregados (multicomponente com composição média semelhante), não-estruturados e segregados (seres individuais distintos, multicomponentes) e, estruturados e segregados (indivíduos distintos, multicomponentes). Para o estudo da fermentação alcoólica, o modelo não-estruturado e não-segregado é o mais utilizado para descrever o comportamento das variáveis envolvidas.

1.1.1 Modelos cinéticos

A equação de Monod relaciona matematicamente de maneira simples a taxa específica de crescimento celular à concentração do substrato limitante de crescimento, e é descrita matematicamente pela equação (3.1).

$$\mu = \mu_{\text{máx}} * \frac{S}{K_s + S} \quad (3.1)$$

Onde: $\mu_{\text{máx}}$ é a taxa máxima de crescimento celular, S a concentração do substrato limitante e K_s a constante de Monod.

A constante de Monod representa o valor de S no qual a taxa específica de crescimento é a metade do seu valor máximo. A equação de Monod considera que todos os componentes do meio de cultura, menos um, estão presentes em altas concentrações, tal que mudanças nestas condições não afetem significativamente a taxa de crescimento celular. Assim, um simples componente torna-se limitante (substrato), e somente as variações na concentração deste componente causariam alterações no comportamento do meio. Entretanto, a equação de Monod somente é aplicável quando não há presença de inibidores de crescimento no meio de cultura, ou quando estes estão em quantidades que não afetem a taxa de crescimento celular.

A taxa específica de crescimento pode ser afetada pela presença de inibidores no meio de cultura, como substratos ou produtos formados. O fenômeno de inibição pelo substrato é normalmente menos importante do que a inibição pelo etanol. DOURADO *et al.* (1987) propõe o modelo descrito pela equação (3.2), enquanto que THATHIPAMALA (1992) utiliza a equação (3.3)

$$\mu = \mu_{\text{máx}} * \frac{S}{\left(K_s + S + \frac{S^2}{K_4} \right)} \quad (3.2)$$

$$\mu = \mu_{\text{máx}} * \left(\frac{S_{\text{máx}} - S}{S_{\text{máx}} - S_{\text{mín}}} \right) \quad (3.3)$$

Onde: $S_{\text{máx}}$ é a máxima concentração de substrato acima da qual não existe crescimento celular e $S_{\text{mín}}$ a concentração onde se inicia o efeito de inibição.

MOULIN *et al.* (1980) propuseram duas expressões para representar a inibição pelo substrato: a equação (3.4) para $S > 100$ g/L e $P < 32$ g/L, e a equação (3.5) para $S > 100$ g/L e $P > 32$ g/L.

$$\mu = \mu_i^{[K_1(S-100)]} \quad (3.4)$$

$$\mu = \mu_i^{[K_1(S-100)][K_2(S-100)P]} \quad (3.5)$$

Onde: K_1 e K_2 são constantes empíricas e μ_i possui uma dependência exponencial com o produto (P).

Para a presença de um produto inibidor P, GHOSE & TYAGI (1979) utilizaram uma relação linear equação (3.6) para descrever a dependência de μ_i velocidade específica de crescimento na presença de etanol, com a concentração deste produto.

$$\mu_i = \mu_{\max} K_a P = \mu_{\max} \left[1 - \frac{P}{P_{\max}} \right] \quad (3.6)$$

Uma relação exponencial equação (3.7) foi proposta por AIBA *et al.* (1968), MOULIN *et al.* (1980) e BONOMI *et al.* (1981).

$$\mu_i = \mu_{\max}^{-K_b P} \quad (3.7)$$

AIBA & SHODA (1969) e NOVAK *et al.* (1981) testaram uma relação hiperbólica entre μ_i e P, como mostra a equação (3.8).

$$\mu_i = \mu_{\max} \left[\frac{1}{1 + \frac{P}{K_c}} \right] \quad (3.8)$$

A relação linear representada pela equação 3.6 somente é aplicável quando não há limitação de crescimento pelo substrato ou algum nutriente. As equações (3.7) e (3.8) predizem o crescimento celular e produção de etanol indefinidamente. Este fato não é observado na prática, conforme experimentos de LEE *et al.* (1983), LEE & CHANG (1987) e JARZEBSKI *et al.* (1989), que demonstraram haver um limite acima do qual cessa o crescimento celular e a produção de etanol.

BAZUA & WILKE (1977) propuseram uma relação parabólica, representada pela equação (3.9).

$$\mu_i = \mu_{\max} \left(1 - \frac{P}{P_m} \right)^{0,5} \quad (3.9)$$

Entretanto a equação (3.9) não apresentou bom ajuste com os dados experimentais dos autores. Estes testaram uma nova relação equação (3.10) que obteve bom ajuste, mesmo a baixas concentrações de etanol.

$$\mu_i = \mu_{\max} - \frac{cP}{d - P} \quad (3.10)$$

LEVENSPIEL (1980) revisou e generalizou uma equação matemática para o crescimento celular contendo um termo para inibição pelo produto equação (3.11).

$$r_x = \mu X = \mu_{\max} \left[1 - \frac{P}{P_m} \right]^n \left[\frac{S}{K_s + S} \right] X \quad (3.11)$$

sendo P_m a concentração limite do produto inibidor. LEVENSPIEL (1980) demonstrou que para uma concentração de P bem menor que o valor de P_m , a equação 3.11 se reduz à equação 3.12.

$$r_x = \mu X = \left[\frac{S}{K_s + S} \right] X \quad (3.12)$$

A equação (3.12) é equivalente a cinética de Monod. Quando a concentração de substrato S é bem maior que a constante de Monod K_s , a equação (3.11) origina a equação (3.13), caracterizando uma cinética puramente inibitória.

$$r_x = \mu X = \mu_{máx} \left[1 - \frac{P}{P_m} \right]^n X \quad (3.13)$$

A relação de LUONG (1985) descreve a dependência de μ_i com a concentração de produto P é representada pela equação (3.14)

$$\mu_i = \mu_{máx} \left[1 - \left(\frac{P}{P_m} \right)^n \right] \quad (3.14)$$

A versatilidade das equações generalizadas parabólicas e do tipo (3.14) favorecem a sua aceitação. Principalmente para esta última, quando n tende para 1, esta relação tende para o tipo linear. Quando $n < 1$, a cinética prevista é a exponencial, ou quando $n > 1$, a equação (3.14) pode ser aproximada para descrever um comportamento parabólico.

O modelo descrito por GHOSE & THYAGI (1979) leva em consideração o efeito do substrato limitante (K_s), inibição pelo substrato (K_i) e inibição pelo produto linear ($P_{máx}$) e é dado pela equação (3.15).

$$\mu = \mu_{máx} * \frac{S}{\left(S + K_s + \frac{S^2}{K_i} \right)} * \left(1 - \frac{P}{P_{máx}} \right) \quad (3.15)$$

SEVELY *et al.* (1981) leva em consideração o efeito do substrato limitante (K_s), sem inibição pelo substrato (K_i) e inibição pelo produto (K_p) e é dado pela equação (3.16).

$$\mu = \mu_{\max} * \left(\frac{S}{S + K_s} \right) * \left(\frac{K_p}{P + K_p} \right) * \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right) \quad (3.16)$$

LEVENSPIEL (1980) leva em consideração o efeito do substrato limitante (K_s), sem inibição pelo substrato (K_i) e inibição pelo produto exponencial ($P_{\max}$) e é dado pela equação (3.17).

$$\mu = \mu_{\max} * \left(\frac{S}{S + K_s} \right) * \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right)^n \quad (3.17)$$

O modelo descrito por LEE *et al.* (1983) leva em consideração o efeito do substrato limitante (K_s), sem inibição pelo substrato (K_i), inibição pelo produto ($P_{\max}$) e massa celular ($X_{\max}$) e é dado pela equação (3.18).

$$\mu = \mu_{\max} * \left(\frac{S}{S + K_s} \right) * \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right)^n * \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right)^m \quad (3.18)$$

O modelo descrito por JIN *et al.* (1981) leva em consideração o efeito do substrato limitante (K_s), inibição pelo substrato (K_i) e inibição pelo produto exponencial ($P_{\max}$) e é dado pela equação (3.19).

$$\mu = \mu_{\max} * \left(\frac{S}{S + K_s} \right) * (Exp)^{((-K_1 * P) - (K_2 * S))} \quad (3.19)$$

1.2 Modelos Matemáticos Aplicados À Fermentação Contínua Utilizando Leveduras Floculantes

Com o objetivo de entender melhor a dinâmica do processo de fermentação contínua com leveduras floculantes em reatores tipo torre, e desenvolver uma estratégia de controle confiável para uma aplicação industriais deste processo muitos modelos matemáticos tem sido desenvolvidos por vários pesquisadores.

ADMASSU *et. al.* (1985) trabalhando com um fermentador tipo torre operando continuamente com altas concentrações de leveduras floculantes e altas produtividades em etanol, obteve um modelo cinético com termos de inibição pelo etanol e limitação pelo substrato. Segundo o autor a hidrodinâmica do fermentador aproxima-se do “plug-flow” com um número de dispersão de 0,16 obtido experimentalmente com traçador.

JONES *et. al.* (1984) trabalhando com uma cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae* em um fermentador contínuo tipo torre utilizando um sistema de separação de células por decantação acoplado na parte superior, ajustou os dados obtidos experimentalmente por um modelo cinético linear onde são consideradas as inibições pelo etanol e a dependência pelo substrato. Conversões de substrato, rendimento em etanol e produtividade foram estudadas para duas concentrações iniciais de substrato (130 e 180 g/L). Neste sistema foi obtida uma produtividade de 12 g etanol/ L. h com rendimentos de conversão em etanol de 90 % do valor teórico.

Segundo JONES *et. al.* (1984) o reator de leito fluidizado utilizando leveduras floculantes é modelado utilizando as equações (3.20) a (3.22). Na modelagem considera-se que a densidade do leito formado, a densidade da fase líquida, massa celular e a temperatura permanecem constantes.

$$-\frac{dS}{dz} = \frac{\mu}{Y_{X/S}} * \frac{A}{F} \quad (3.20)$$

$$\frac{dP}{dZ} = \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}} * \mu * \frac{A}{F} \quad (3.21)$$

$$rp = vm * X * \left(1 - \frac{P}{Pm}\right) * \left(\frac{S}{Kp + S}\right) \quad (3.22)$$

Onde:

Yp/s – Rendimento em Etanol: Produto formado/ substrato consumido;

Yx/s – Produção de Células: Massa celular produzida/ substrato consumido;

A - Área transversal de escoamento (cm²);

μ- Velocidade de crescimento específica (h⁻¹);

F – Vazão de Alimentação (mL/ h);

A equação (3.22) é idêntica a do modelo apresentado por GHOSE & TYAGI (1979) sem o termo de inibição pelo substrato e a do modelo de LEVENSPIEL (1980) considerando uma inibição pelo produto linear.

CHEN *et. al.* (1993) estudou a dependência da altura do leito de células formado com a concentração de substrato na alimentação, num fermentador tipo torre de 6 L operando com células floculantes de *Saccharomyces uvarum* ATCC 26602. Quando a concentração de substrato era reduzida a valores abaixo do crítico, o tamanho dos flocos de células agregados que constituíam o leito diminuía, formando assim uma região bem agitada acima do leito devido a grande quantidade de CO₂ produzido, esta região era composta por pequenos agregados celulares fluidizados. A modelagem do fermentador era feita dividindo-se o mesmo em duas regiões distintas, o leito de células formado era tratado considerado um escoamento do tipo “plug-flow” com dispersão axial e a região fluidizada acima do leito era considerada como um reator CSTR agitado. A altura do leito formado pode ser assim estimada por este modelo, baseado numa concentração crítica de substrato pré-determinada. A concentração final de etanol e a produtividade também poderiam ser preditas pelo modelo obtido experimentalmente.

OLIVEIRA *et. al.* (1998) desenvolveu um modelo matemático para se estimar a performance de uma fermentação contínua num reator tipo torre com reciclo de células floculantes testando diversos modelos incluindo lineares, parabólicos, hiperbólicos, exponenciais e não-lineares. Parâmetros cinéticos foram estimados no estado-estacionário

para diferentes concentrações de substrato na alimentação (160, 170, 180, 190, 200 g/L) a temperatura de 30°C e uma taxa de diluição constante de 0,2/h .

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A modelagem matemática de bioreatores é de extrema importância para que se possa entender seu comportamento. Desta forma, foram realizados ensaios em reatores de bancada em diferentes condições para obtenção de dados experimentais para seleção e ajuste de modelos cinéticos. Amostras foram retiradas de três pontos ao longo do reator, sendo possível desta forma obter o perfil de concentração de ART (Açúcares Redutores Totais) e etanol ao longo do reator. A modelagem matemática do reator foi realizada primeiramente considerando o reator como tubular sem dispersões axial e radial. A concentração de células foi considerada decrescente ao longo do reator, devido ao incremento da porosidade do leito na parte superior do mesmo.

A vazão de fluido reagente no interior do reator foi calculada, utilizando-se a porosidade do leito. Foram testados modelos cinéticos do tipo não estruturados e não segregados, onde se levou em conta a limitação pelo substrato, a inibição pelo substrato, produto e massa celular.

Uma rotina de ajuste elaborada utilizando o programa DELPHI 5.0 foi desenvolvida para ajustar o grupo de valores dos parâmetros cinéticos que melhor se adequaram aos dados experimentais, através da resolução do conjunto de equações diferenciais de primeira ordem.

O cálculo dos parâmetros cinéticos para cada modelo da rotina de ajuste está baseado na minimização da somatória dos desvios quadrados (equação 3.23), isto é, para encontrar os parâmetros que melhor se ajustam aos modelos, onde a somatória dos desvios quadrados deve ser a menor possível.

$$D = \sum_{i=1}^N (x_i - x_e)^2 \quad (3.23)$$

Onde:

N = número de pontos

x_i = dados calculados pelo modelo

x_e = dados experimentais

2.1 Obtenção dos Dados Experimentais Utilizados no Ajuste dos Parâmetros Cinéticos

2.1.1 Linhagem

A cepa de levedura *Saccharomyces sp* utilizada nesta etapa foi isolada da unidade de fermentação industrial da Destilaria Junqueira durante a safra de 2000, e previamente selecionada conforme descrito no Capítulo 2 (item 2.4.2).

2.1.2 Inóculo

O Inóculo que foi utilizado na partida do sistema foi preparado em Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio esterilizado (15 minutos/121°C) composto de: Sacarose 150 g/L, Fosfato diácido de potássio 5,0 g/L; Cloreto de amônio 5,0 g/L; Sulfato de magnésio heptaidrato 1,0 g/L; Cloreto de potássio 1,0 g/L; Extrato de levedo 6,0 g/L. A levedura crescida em “slants” de PDA (Potato Dextrose Agar) por 24 h a 32°C foi ressuspensa em água esterilizada e inoculada em concentração de 10% do volume total do meio fermentativo. Os frascos foram incubados em “shaker” por 24 h a 32°C a uma rotação de 150 rpm. O fermentado foi alimentado ao sistema de fermentação através de bomba peristáltica.

2.1.3 Substrato de Alimentação

O substrato utilizado na alimentação do sistema piloto foi um meio sintético concentrado diluído em linha (Capítulo 2- item 2.2).

2.1.4 Condução dos Ensaios para Obtenção dos Dados Experimentais

Após a fase inicial de crescimento celular três ensaios foram realizados com vazões de alimentação variáveis que resultaram em tempos de residência de 2,92 h; 2,33 h e 1,94 h respectivamente, mantendo-se a concentração de substrato constante e igual a 150 g/L em cada ensaio. Nestes ensaios a retirada de amostra deu-se em três pontos distintos ao longo

do reator (7, 25 e 61 cm), das quais foram realizadas análises de: etanol, sacarose, glicose, frutose e glicerol.

2.2 Ajuste dos Parâmetros Cinéticos Considerando uma Única Fonte de Substrato (ART)

2.2.1 Modelos Cinéticos Testados

Em trabalhos realizados anteriormente VIEGAS (2002) observou-se que os reatores tipo torre operando com leveduras flocculantes se comportam de forma que duas zonas distintas podem ser observadas (Figuras 3.1 e 3.2). A primeira zona, onde existe a formação de um leito de células de levedura foi tratado na modelagem como reator de leito fixo sem dispersão axial e radial (Figura 3.1). Para esta região foram testados seis modelos cinéticos clássicos para descrever processos de fermentação alcoólica.

Na segunda zona do reator, é observada a presença de pequena quantidade de células dispersas no meio (Figura 3.2). Neste trabalho, a conversão de ART nesta zona foi desprezada, assumindo que o valor de ART obtido para $Z=61$ cm é igual ao valor referente ao término do leito ($Z=45$ cm). O objetivo desta modelagem foi descrever o comportamento do sistema, comparando-o aqueles obtidos nos ensaios práticos realizados no estado estacionário.

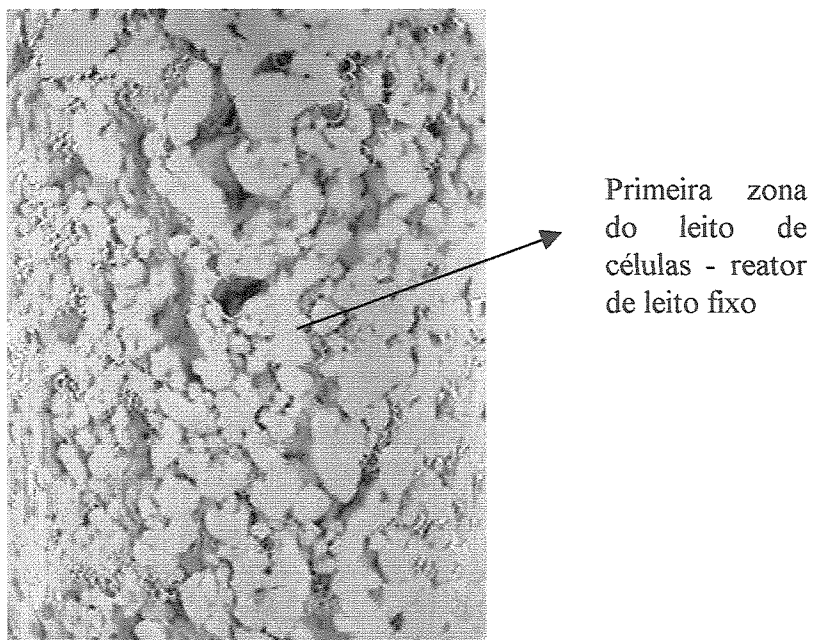


Figura 3.1 – Foto da Primeira Região do Leito formado (Considerada como um reator de leito fixo)

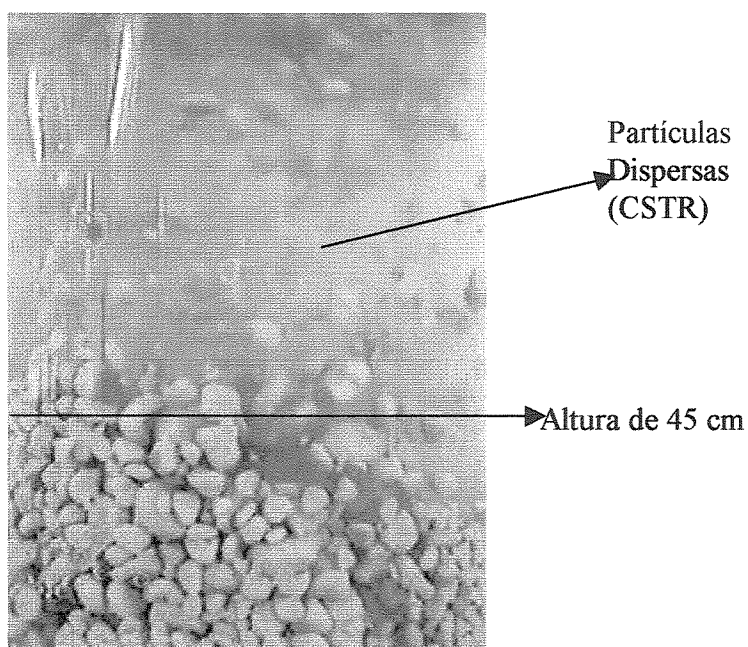


Figura 3.2 – Foto da Segunda Região do Reator (Células em Forma de Partículas Dispersas)

Os modelos cinéticos aplicados foram do tipo não estruturados e não segregados com termos de inibição pelo produto, substrato e células e limitação pelo substrato. Foram testados modelos encontrados na literatura, sendo eles os propostos por: GHOSE & THYAGI (1979), SEVELY *et al* (1981), JIN *et al.* (1981), LEE *et al.* (1983), LEVENSPIEL (1980) e um modelo que foi desenvolvido durante este projeto, denominado Ghose Modificado (equação 3.24) que leva em consideração o efeito do substrato limitante (K_s), inibição pelo substrato (K_i) e inibição pelo produto exponencial ($P_{m\acute{a}x}$).

A Tabela 3.1 mostra as equações dos modelos testados no ajuste dos parâmetros cinéticos.

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} * \left(\frac{S}{S + K_s + \left(\frac{S^2}{K_i} \right)} \right) * \left(1 - \frac{P}{P_{m\acute{a}x}} \right)^n \quad (3.24)$$

Tabela 3.1 - Equações dos modelos testados no ajuste dos parâmetros cinéticos. Onde: K_s – Efeito do substrato limitante; K_i – Efeito de inibição pelo produto; $P_{m\acute{a}x}$ – Termo de inibição pelo produto, $\mu_{m\acute{a}x}$ velocidade específica de crescimento celular, S – Concentração de Substrato; P – Concentração do produto, n – Termo exponencial de inibição pelo produto.

Modelo Testado	Equação
GHOSE & THYAGI (1979)	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} * \frac{S}{\left(S + K_s + \frac{S^2}{K_i} \right)} * \left(1 - \frac{P}{P_{m\acute{a}x}} \right)$
SEVELY <i>et al.</i> (1981)	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} * \left(\frac{S}{(S + K_s)} \right) * \left(\frac{K_p}{(P + K_p)} \right) * \left(1 - \frac{P}{P_{m\acute{a}x}} \right)$
LEVENSPIEL (1980)	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} * \left(\frac{S}{S + K_s} \right) * \left(1 - \frac{P}{P_{m\acute{a}x}} \right)^n$
LEE <i>et al</i> (1983)	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} * \left(\frac{S}{S + K_s} \right) * \left(1 - \frac{P}{P_{m\acute{a}x}} \right)^n * \left(1 - \frac{X}{X_{m\acute{a}x}} \right)^m$
JIN <i>et al.</i> (1981)	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} * \left(\frac{S}{S + K_s} \right) * (Exp)^{((-K_1 * P) - (K_2 * S))}$

A modelagem matemática foi feita segundo JONES *et al.* (1984) e as equações diferenciais utilizadas estão descritas pelas equações (3.20) e (3.21) que descrevem o perfil de ART e etanol ao longo do comprimento reator.

2.3 Ajuste dos Parâmetros Cinéticos Considerando duas Fontes de Substrato (Glicose e Frutose)

2.3.1 Obtenção dos Dados Experimentais

Os dados experimentais utilizados no ajuste dos parâmetros cinéticos foram obtidos conforme descrito neste capítulo (item 2.1).

2.3.2 Modelo Cinético Testado Considerando a Presença de dois Substratos (Glicose e Frutose)

Nesta etapa foi testado o Modelo TOSETTO (2002), que é do tipo não estruturado e não segregado com termos de limitação pelo substrato, inibição pelo substrato e produto, que leva em consideração duas fontes de substrato, sendo que para a glicose e a frutose o modelo a ser utilizado é o de GHOSE modificado (equações 3.25 e 3.26), porém para a frutose, este modelo foi acrescido de um termo desenvolvido por TOSETTO (2002) que descreve a diauxia. (Diauxia é a característica que um microrganismo tem em consumir preferencialmente um substrato, que neste caso, foi a glicose). O consumo da sacarose ao longo do reator é representada pela equação 3.27.

$$\mu_{Frutose} = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \left(1 - \frac{G}{F}\right) \cdot \frac{F}{K_s + F + \frac{F^2}{K_i}} \cdot \left(1 - \frac{P}{P_{m\acute{a}xfr}}\right)^{nfr} \quad (3.25)$$

$$\mu_{Glicose} = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \frac{G}{K_s + G + \frac{G^2}{K_i}} \cdot \left(1 - \frac{P}{P_{m\acute{a}xgl}}\right)^{ngl} \quad (3.26)$$

$$v_{Sacarose} = v_{m\acute{a}x} \cdot \left(\frac{S}{S + K_s + \left(\frac{S^2}{K_i}\right)} \right) \cdot \left(1 - \frac{P}{P_{m\acute{a}x}}\right) \cdot \left(1 - \frac{G}{G_{m\acute{a}x}}\right) \cdot \left(1 - \frac{F}{F_{m\acute{a}x}}\right) \quad (3.27)$$

Onde:

$- \left(1 - \frac{G}{F}\right)$: termo de diauxia, sendo: G a concentração de glicose (g/L) e F a concentração de frutose (g/L).

$-v$: velocidade específica de hidrólise da sacarose (h^{-1})

Segundo SCHLEGEL (1990), o efeito de diauxia consiste no consumo preferencial de um substrato em relação a outro quando mais de um estão presentes no meio fermentativo, que é o caso da fermentação alcoólica com meios à base de sacarose. O surgimento de duas fases de crescimento é encontrada em meios que contém misturas de substratos. Na mistura de glicose e sorbitol, por exemplo, a *E.coli* utiliza somente a glicose primeiro, a glicose induz a síntese das enzimas para seu consumo, bloqueando ao mesmo tempo o consumo de sorbitol. O sorbitol só será consumido quando toda a glicose for consumida.

O ajuste dos parâmetros cinéticos foi realizado através da resolução de equações diferenciais (equações 3.28 a 3.31), obtidas através do balanço de massa ao longo do comprimento (Z) do reator.

$$\frac{dP}{dZ} = \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}} * \mu * \frac{A}{F} \quad (3.28)$$

$$-\frac{dS}{dz} = \frac{v * X}{Y_{X/S}} * \frac{A * \varepsilon}{F} \quad (3.29)$$

$$\frac{dG}{dz} = 0,526 * (S_{i-1} - S_i) - \frac{A * \varepsilon}{Y_{X/S} * F} * \mu_G * X \quad (3.30)$$

$$\frac{dF}{dz} = 0,526 * (S_{i-1} - S_i) - \frac{A * \varepsilon}{Y_{X/S} * F} * \mu_F * X \quad (3.31)$$

Onde:

A - Área transversal de escoamento (cm^2).

F - Vazão de alimentação (mL/ h).

μ - velocidade específica de crescimento (h^{-1}).

ε - Porosidade do leito de células

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ajuste dos Parâmetros Cinéticos Considerando uma Única Fonte de Substrato (ART)

A Tabela 3.2 apresenta os resultados experimentais obtidos nos ensaios realizados conforme descrito no item 2.1. Estes dados foram utilizados para ajustar os parâmetros cinéticos dos modelos testados.

Tabela 3.2 – Ensaios Experimentais: ART (g/L) e Etanol (g/L) em função dos diferentes tempos de residência (h) testados

Z(cm)	ART (g/L)			Etanol (g/L)		
	tr =2,92 h	Tr =2,33 h	tr =1,94 h	tr =2,92 h	tr =2,33 h	tr =1,94 h
0	231,94	225,28	200,34	0	0	0
7	100,25	119,00	108,42	40,61	40,51	36,39
25	25,32	57,00	73,23	88,38	68,34	64,97
61	21,66	48,00	63,61	92,96	74,50	70,00

Pode-se perceber pelos dados apresentados na Tabela 3.2 que a maior conversão de substrato e consequentemente maior produção de etanol se deu no primeiro estágio do reator (até Z=25) fato este explicado pela alta concentração celular nesta região.

A partir dos dados da Tabela 3.2 os parâmetros cinéticos foram ajustados para os seis diferentes modelos estudados, conforme descrito no item 2.2.1. As Tabelas 3.3, 3.4 e 3.5 mostram os valores dos parâmetros cinéticos ajustados para os tempos de residência de 2,92; 2,33 e 1,94 h respectivamente, assim como a somatória do desvio quadrado encontrado para cada modelo.

Tabela 3.3- Parâmetros Cinéticos obtidos à uma vazão de alimentação de 480 mL/hora (tr = 2,92 h), onde: Ks – termo de limitação pelo substrato; Ki – termo de inibição pelo substrato; Kp – termo de inibição pelo produto; Pmáx – concentração de etanol onde o crescimento cessa; K1 – termo de inibição pelo produto GHOSE ; K2 – termo de inibição pelo substrato GHOSE ; X máx – concentração de células onde cessa o crescimento celular; n - potência da inibição pelo produto; m – potência da inibição pela massa celular e Desvio² – desvio quadrático dos dados obtidos pelo modelo e experimentais.

Modelos	Parâmetros Cinéticos									
Testados										
	Ks	K1	K2	Kp	Ki	n	m	Pmáx	X máx	Desvio ²
Ghose	23	-	-	-	73	1,0	-	92	-	1,4300
Modificado										
Lee (1983)	20	-	-	-	-	0,9	0,8	92	156	164,73
Jin (1981)	29	0,04	0	-	-	-	-	-	-	378,76
Ghose (1979)	23	-	-	-	73	-	-	92	-	1,4300
Levenspiel	160	-	-	-	-	1,1	-	93	-	455,00
(1980)										
Sevely (1981)	0	-	-	17	-	-	-	96	-	155,76

Tabela 3.4- Parâmetros Cinéticos obtidos à uma vazão de alimentação de 600 mL/hora (tr = 2,33 h), onde: Ks – termo de limitação pelo substrato; Ki – termo de inibição pelo substrato; Kp – termo de inibição pelo produto; Pmáx – concentração de etanol onde o crescimento cessa; K1 – termo de inibição pelo produto GHOSE ; K2 – termo de inibição pelo substrato GHOSE ; X máx – concentração de células onde cessa o crescimento celular; n - potência da inibição pelo produto; m – potência da inibição pela massa celular e Desvio² – desvio quadrático dos dados obtidos pelo modelo e experimentais.

Modelos	Parâmetros Cinéticos									
Testados										
	Ks	K1	K2	Kp	Ki	n	m	Pmáx	X máx	Desvio ²
Ghose	6	-	-	-	84	1,3	-	78	-	0,69
Modificado										
Lee (1983)	30	-	-	-	-	1,0	0,8	78	156	173,29
Jin (1981)	41	0,05	0	-	-	-	-	-	-	277,09
Ghose (1979)	81	-	-	-	86	-	-	77	-	7,17
Levenspiel	105	-	-	-	-	1,5	-	78	-	455,00
(1980)										
Sevely (1981)	38	-	-	18	-	-	-	82	-	87,47

Tabela 3.5- Parâmetros Cinéticos obtidos à uma vazão de alimentação de 720 mL/hora ($\tau = 1,94$ h), onde: K_s – termo de limitação pelo substrato; K_i – termo de inibição pelo substrato; K_p – termo de inibição pelo produto; $P_{\max}$ – concentração de etanol onde o crescimento cessa; K_1 – termo de inibição pelo produto GHOSE ; K_2 – termo de inibição pelo substrato GHOSE ; $X_{\max}$ – concentração de células onde cessa o crescimento celular; n - potência da inibição pelo produto; m – potência da inibição pela massa celular e Desvio² – desvio quadrático dos dados obtidos pelo modelo e experimentais .

Modelos Testados	Parâmetros Cinéticos									
	K_s	K_1	K_2	K_p	K_i	n	m	$P_{\max}$	$X_{\max}$	Desvio ²
Ghose Modificado	49	-	-	-	114	1,3	-	60	-	8,89
Lee (1983)	80	-	-	-	-	1,1	0,4	59	163	300,34
Jin (1981)	23	0,07	0	-	-	-	-	-	-	209,00
Ghose (1979)	85	-	-	-	102	-	-	59	-	3,75
Levenspiel (1980)	155	-	-	-	-	1,3	-	58	-	65,51
Sevely (1981)	26	-	-	15	-	-	-	61	-	105,70

A partir dos dados contidos nas Tabelas 3.3, 3.4 e 3.5 observa-se que os modelos de GHOSE e o Ghose Modificado (equação 3.24) foram aqueles que apresentaram o melhor ajuste aos dados experimentais, pois apresentaram o menor valor de desvio quadrático quando comparados com os dados experimentais. Os modelos segundo LEVENSPIEL (1980), SEVELY (1980) e LEE (1983) não se ajustaram aos dados experimentais, indicando a existência da inibição pelo substrato (K_i).

Observa-se ainda pelos dados contidos na Tabela 3.3 que o parâmetro n que representa a potência do termo de inibição pelo produto no modelo Ghose modificado assumiu valor igual a 1, mostrando um comportamento linear para o tempo de residência 2,92 horas. Nestas condições, o modelo Ghose modificado (equação 3.24) se reduz ao modelo proposto por GHOSE explicando a igualdade dos parâmetros obtidos para ambos os modelos. Além disto pode ser observado que os valores de K_i obtidos foram elevados indicando assim uma inibição pelo substrato pouco significativa.

Como pode ser ainda observado pelas Tabelas 3.4 e 3.5, para os outros tempos de residência estudados observou-se que os modelos que mais se ajustaram aos dados experimentais foram os mesmos. No entanto valores diferentes para alguns parâmetros foram encontrados e o modelo Ghose modificado (equação 3.24) mostrou um ajuste superior aos dados experimentais quando comparado com o modelo proposto por GHOSE, onde o termo de inibição pelo produto mostrou-se não linear ($n \neq 1$).

As diferenças encontradas de alguns parâmetros nas diferentes condições estudadas podem estar associadas ao efeito da porosidade do leito que aparentemente se altera em função da quantidade de CO_2 liberado por unidade de tempo (velocidade de conversão), assim como às diferentes faixas de concentração de substrato e produto. Isto mostra que as faixas de validade de cada grupo de parâmetros ajustados para os diferentes modelos são bastante restritas, o que limita a sua utilização.

Pode-se perceber ainda pelos dados contidos nas Tabelas 3.3, 3.4 e 3.5 onde foi considerado no ajuste dos parâmetros cinéticos o ART como única fonte de substrato, que os valores de K_s encontrados são elevados, superiores aos valores encontrados na literatura. Para o modelo LEVENSPIEL, fica ainda mais evidente esta incoerência.

As Figuras 3.3 a 3.8 mostram os melhores ajustes obtidos para ensaio realizado, onde os valores calculados para cada modelo ajustado são comparados com os dados experimentais obtidos.

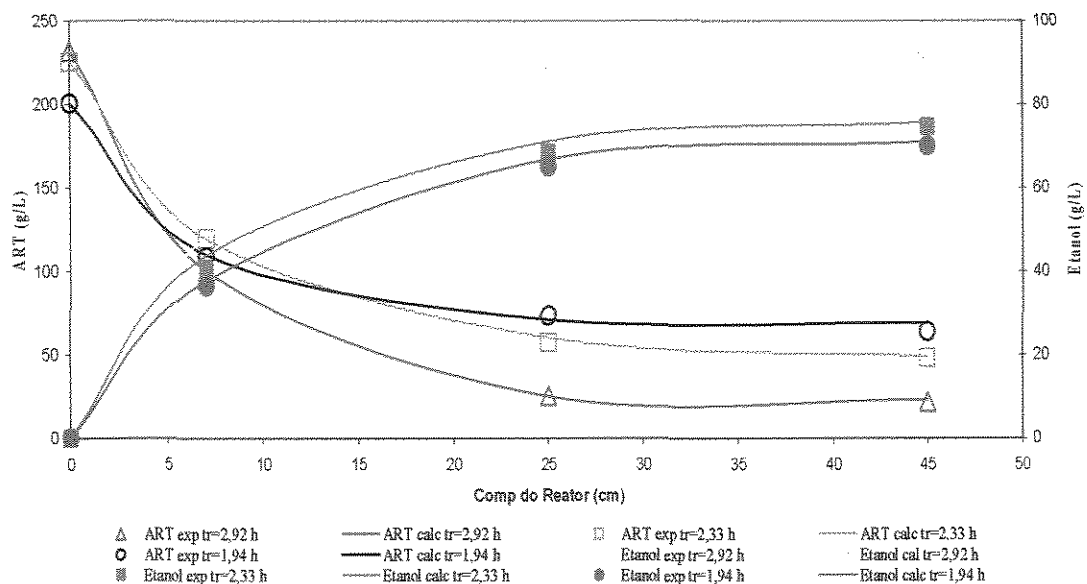


Figura 3.3- Valores de ART(g/L) e Etanol (g/L) experimentais e calculados pelo modelo de Ghose modificado em função do comprimento do reator para cada ensaio realizado.

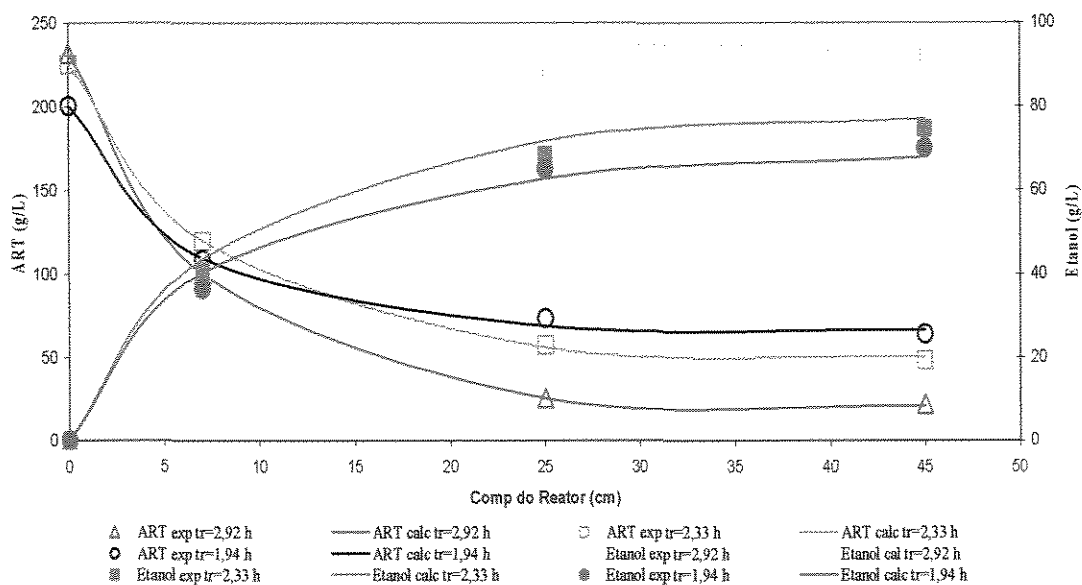


Figura 3.4- Valores de ART(g/L) e Etanol (g/L) experimentais e calculados pelo modelo de GHOSE em função do comprimento do reator para cada ensaio realizado

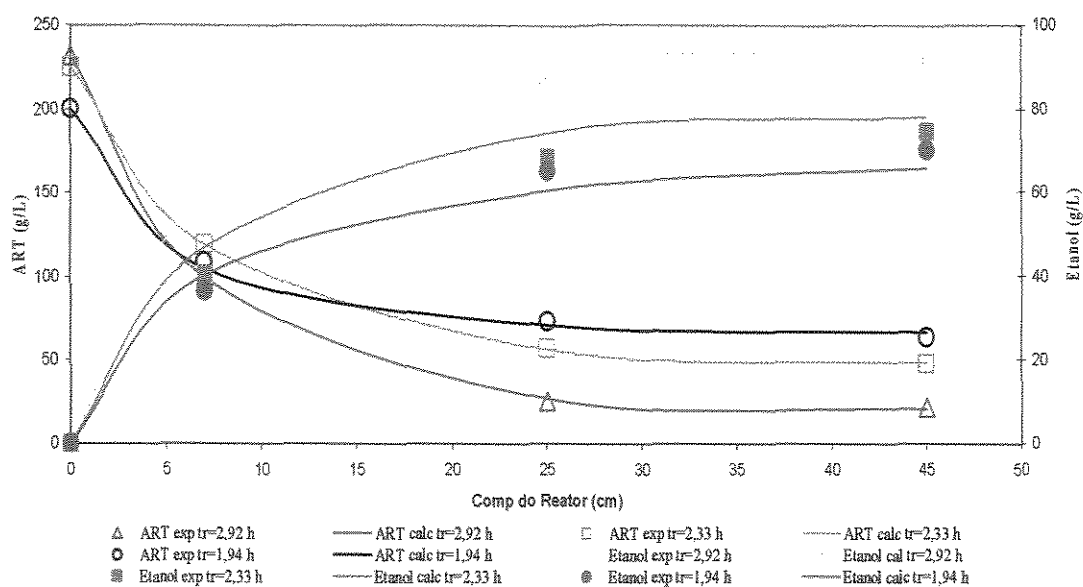


Figura 3.5- Valores de ART(g/L) e Etanol (g/L) experimentais e calculados pelo modelo de Lee em função do comprimento do reator para cada ensaio realizado

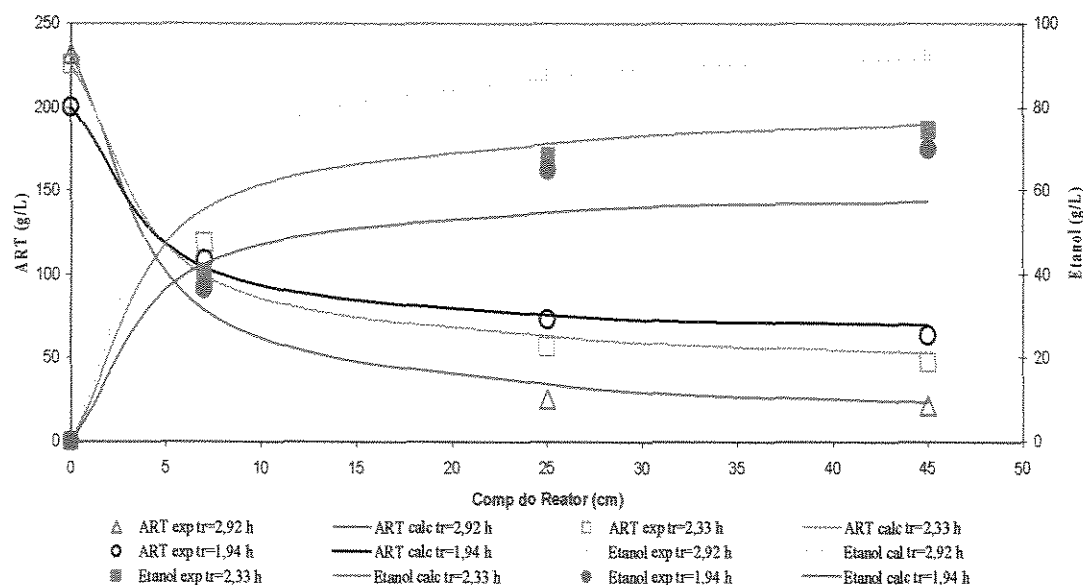


Figura 3.6- Valores de ART(g/L) e Etanol (g/L) experimentais e calculados pelo modelo de Levenspiel em função do comprimento do reator para cada ensaio realizado

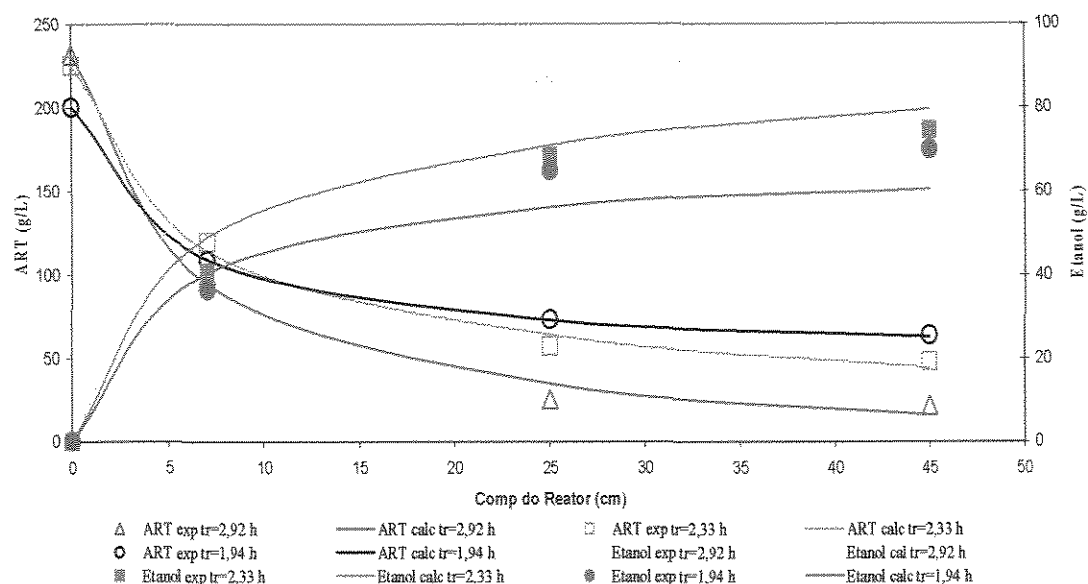


Figura 3.7- Valores de ART(g/L) e Etanol (g/L) experimentais e calculados pelo modelo de Sevely em função do comprimento do reator para cada ensaio realizado

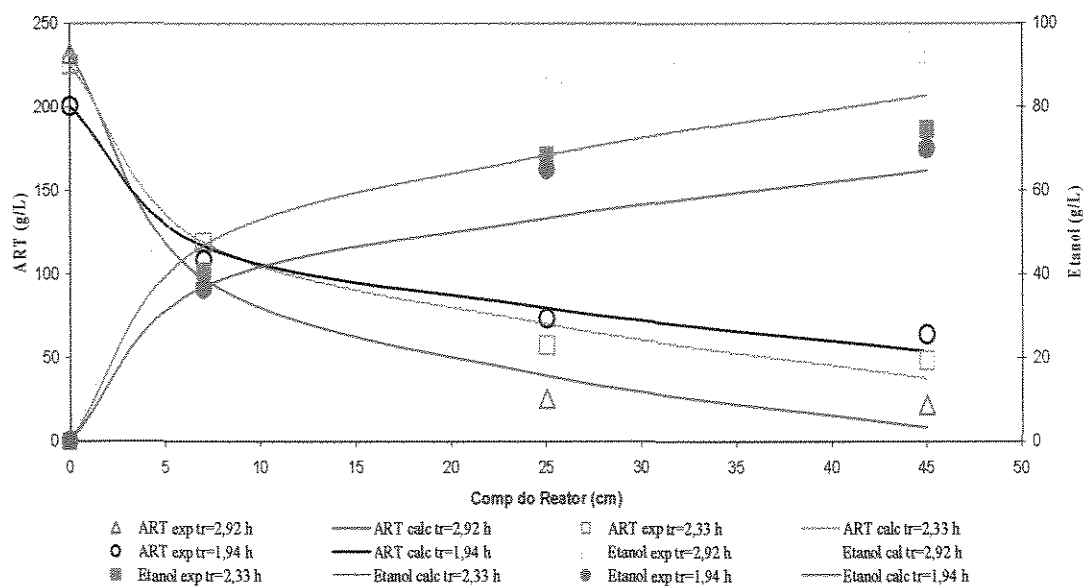


Figura 3.8- Valores de ART(g/L) e Etanol (g/L) experimentais e calculados pelo modelo de JIN em função do comprimento do reator para cada ensaio realizado

Observa-se pelas Figuras 3.3 a 3.8 que apesar das incoerências encontradas no que diz respeito aos valores elevados de K_s , os perfis de consumo de substrato e produção de etanol apresentaram ajustes bastante satisfatórios aos dados experimentais. Pode-se perceber, que os modelos Ghose modificado e o proposto por GHOSE apresentaram melhor ajuste aos dados experimentais.

Pequenos desvios observados em relação à concentração de etanol podem estar ligados ao fato dos modelos utilizados não levarem em consideração a desvinculação da produção do mesmo com o crescimento celular na fase final da fermentação (TOSETTO, 2002).

3.2 Ajuste dos Parâmetros Cinéticos considerando duas fontes de substrato (Glicose e Frutose)

Os valores de K_s muito elevados observados para os modelos onde o ART foi considerado como única fonte de substrato, somado ao perfil de consumo de frutose obtido nos ensaios fermentativos mostrou a necessidade de se trabalhar com modelos diferentes para descrever o consumo dos dois diferentes substratos contidos no meio de fermentação (glicose e frutose), ou seja, a produção de etanol por via fermentativa que utiliza a sacarose como fonte de carbono, deve ser tratada como uma fermentação envolvendo dois substratos.

As incoerências encontradas onde o ART foi considerado como única fonte de substrato, mostra a necessidade de se trabalhar com modelos diferentes para descrever o processo fermentativo que utiliza como substrato a sacarose, devido a hidrólise deste fornecer glicose e frutose como produto, conforme descrito por TOSETTO (2002).

A Tabela 3.6 apresenta os resultados experimentais obtidos conforme descrito no item 2.3 (Capítulo 3).

Tabela 3.6 – Ensaios Experimentais: Glicose (g/L), Frutose (g/L) e Sacarose (g/L) obtidos experimentalmente ao longo do comprimento do reator em função dos diferentes tempos de residência (h) testados. Onde: Z – Comprimento do reator.

Z (cm)	Glicose (g/L)			Frutose (g/L)			Sacarose (g/L)		
	tr=2,92	tr=2,33	tr=1,94	tr=2,92	tr=2,33	tr=1,94	tr=2,92	tr=2,33	tr=1,94
	0	0	0	0	0	0	189,05	181,75	175,73
7	16,85	26,91	15,14	29,94	40,46	22,93	58,09	41,33	117,42
25	5,41	20,52	16,68	11,74	36,78	30,54	7,70	7,41	21,41
45	4,96	14,59	16,45	10,87	29,41	30,77	6,08	6,30	18,38

A partir dos dados contidos na Tabela 3.6 traçou-se os perfis de consumo de substrato em função do comprimento do reator para cada tempo de residência testado (Figuras 3.9 a 3.11).

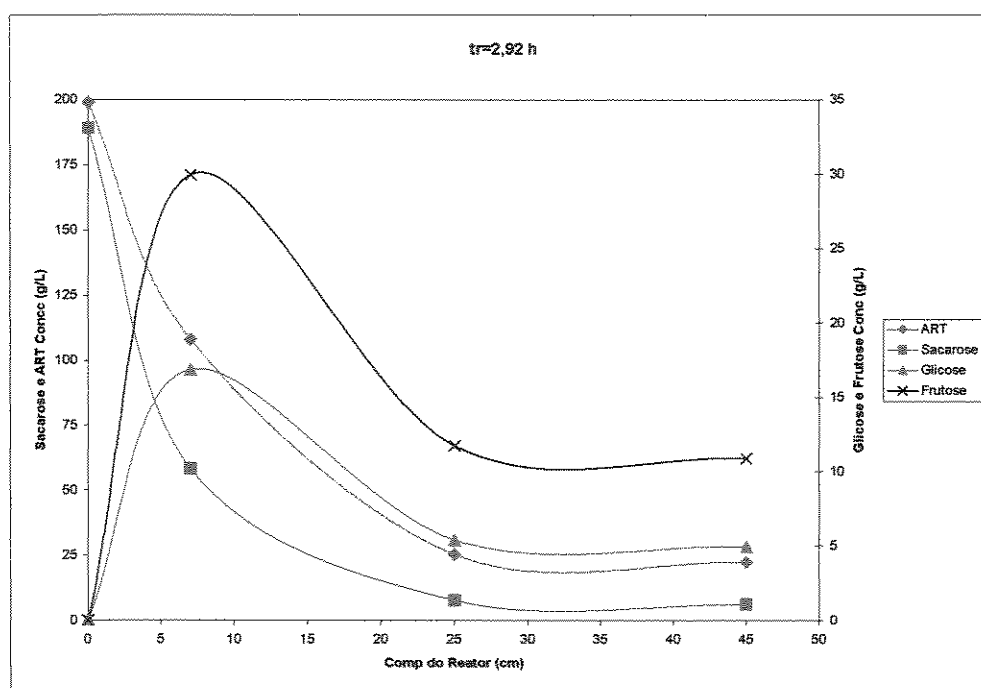


Figura 3.9- Perfil de consumo de substrato em função do comprimento do reator para o tempo de residência 2,92 h.

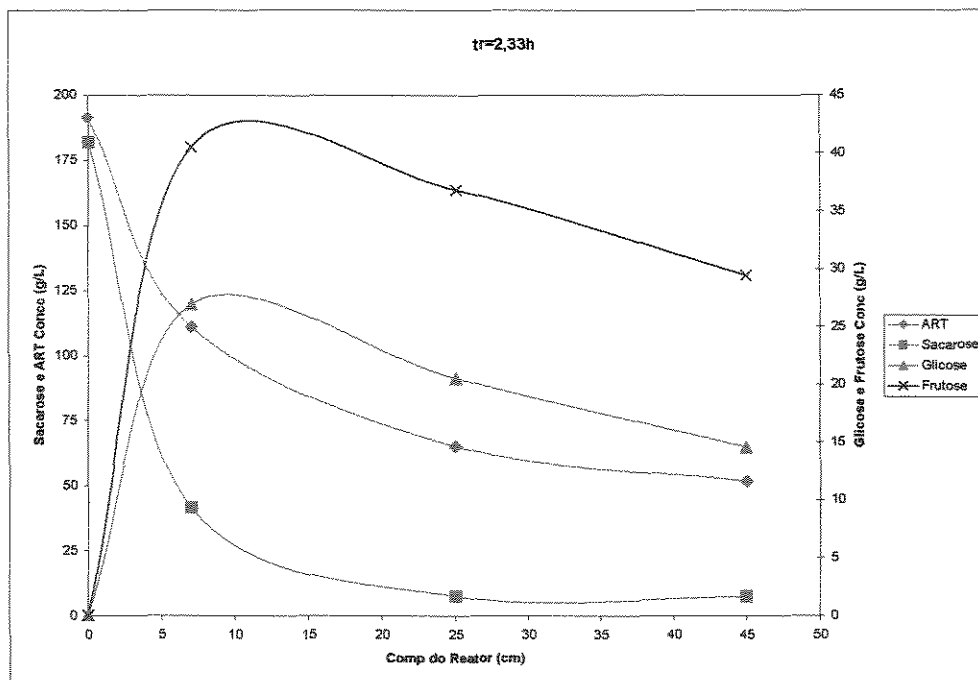


Figura 3.10- Perfil de consumo de substrato em função do comprimento do reator para o tempo de residência 2,33 h

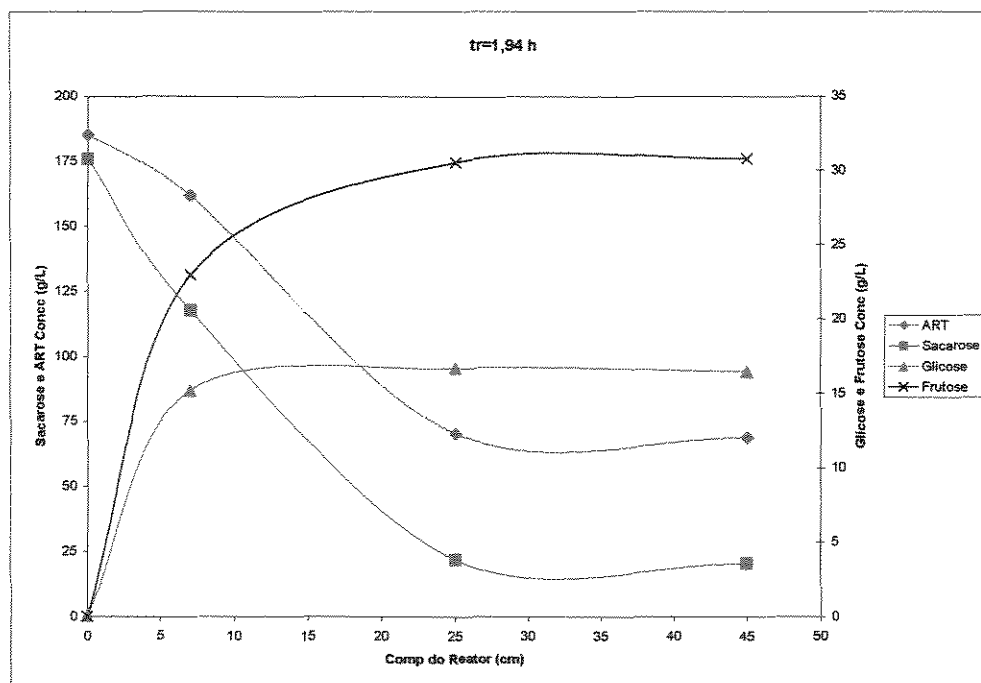


Figura 3.11- Perfil de consumo de substrato em função do comprimento do reator para o tempo de residência 1,94 h

Pelos dados experimentais contidos nas Figuras 3.9 a 3.11 observa-se uma diferença bastante acentuada no perfil de consumo da glicose e frutose, mostrando a necessidade de se utilizar modelos diferenciados para cada um destes substratos, onde se pode perceber que o consumo de frutose é mais lento que o da glicose, indicando um efeito de diauxia devido à concentração de glicose no meio.

A partir dos dados da Tabela 3.6 os parâmetros cinéticos do modelo TOSETTO (2002) testado foram ajustados. A Tabela 3.7 mostra estes valores, assim como a somatória dos desvios quadrados encontrados levando-se em consideração a presença de duas fontes de substrato na alimentação (frutose e glicose) devido a hidrólise da sacarose.

Tabela 3.7- Parâmetros Cinéticos obtidos para o modelo TOSETTO (2002) (dois substratos), onde: Ks_{gl} – termo de limitação pela glicose; Ks_{fr} – termo de limitação pela frutose; Ks_{sac} – termo de limitação pela sacarose; Ki_{gl} – termo de inibição pela glicose; Ki_{fr} – termo de inibição pela frutose; Ki_{sac} – termo de inibição pela sacarose; $Pmáx_s$ – concentração de etanol onde o crescimento cessa - sacarose; $Pmáx_g$ – concentração de etanol onde o crescimento cessa - glicose; $Pmáx_f$ – concentração de etanol onde o crescimento cessa - frutose; n_{fr} - potência da inibição pelo produto - frutose; n_{gl} – potência da inibição pelo produto - glicose e D^2_{glic} – desvio quadrático dos dados obtidos pelo modelo e experimentais – glicose; D^2_{frut} – desvio quadrático dos dados obtidos pelo modelo e experimentais – frutose.

tr (h)		Parâmetros Cinéticos														
n_{fr}	n_{gl}	Ks_{fr}	Ks_{gl}	Ks_{sac}	$Pmáx_s$	Ki_{fr}	Ki_{gl}	$Pmáx_F$	$Pmáx_G$	$Fmáx_S$	$Gmáx_S$	Ki_{sac}	$D^2_{Glic.}$	D^2_{Frut}		
2,92	0,6	1,2	3,0	0,9	4,0	113	20	6,0	88	68	30	44	58	103,58	248,95	
2,33	1,1	1,2	2,0	0,8	3,8	119	24	6,2	82	68	36	46	52	203,96	241,13	
1,94	0,9	1,2	2,0	0,8	3,7	112	22	6,4	85	68	32	47	53	198,74	215,68	

Pelos dados contidos na Tabela 3.7 observa-se que as incoerências encontradas quando da utilização do ART como único substrato desapareceram quando se trabalha com modelos separados para o consumo de glicose e frutose. Este fato vem confirmar que os processos fermentativos que utilizam como fonte de carbono a sacarose, devem ser tratados como processos contendo dois substratos distintos, glicose e frutose, e ainda devem levar em consideração a preferência do microrganismo em consumir a glicose (diauxia), conforme descrito por TOSETTO (2002).

As Figuras 3.12 a 3.14 mostram os melhores ajustes obtidos para ensaio realizado. Estes valores foram calculados utilizando-se o Modelo TOSETTO (2002) a partir dos dados experimentais.

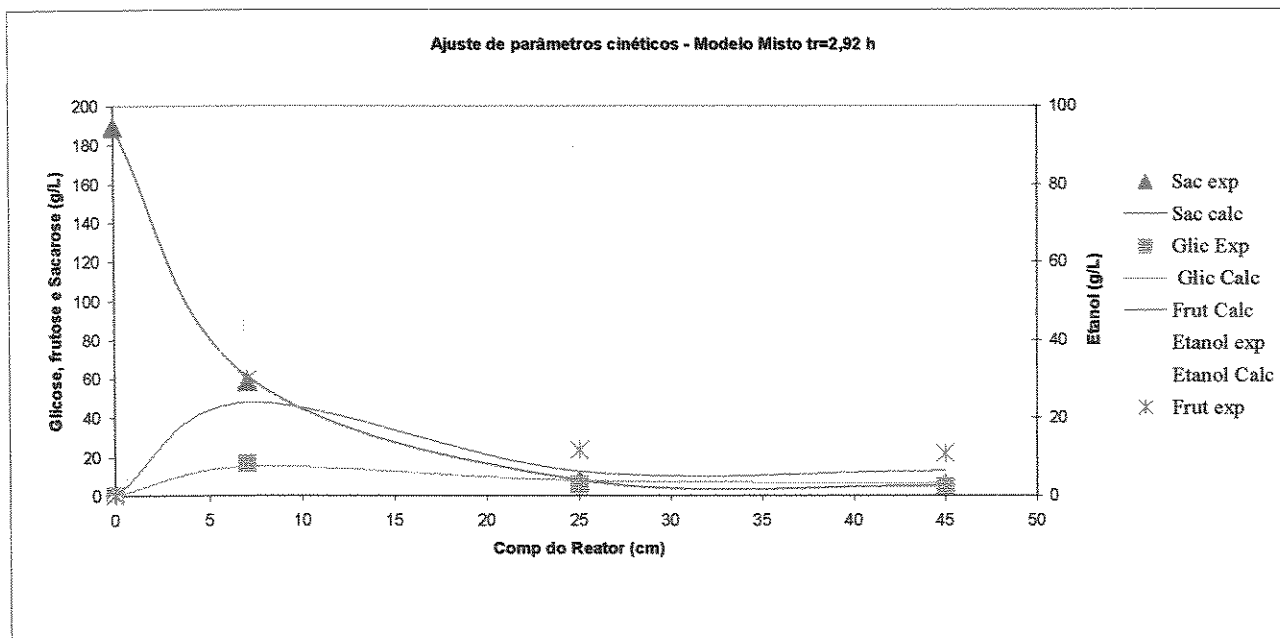


Figura 3.12- Valores de Sacarose (g/L), Glicose, Frutose e Etanol (g/L) experimentais e calculados pelo modelo TOSETTO (2002) em função do comprimento do reator para o tempo de residência de 2,92 h

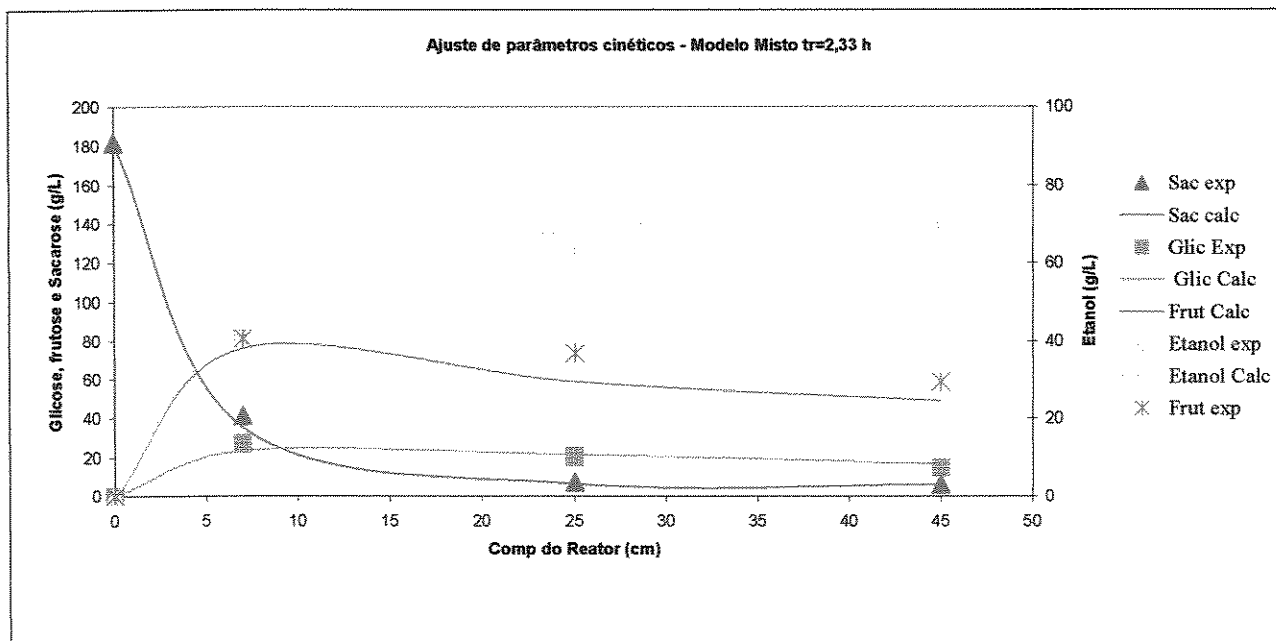


Figura 3.13- Valores de Sacarose (g/L), Glicose, Frutose e Etanol (g/L) experimentais e calculados pelo modelo TOSETTO (2002) em função do comprimento do reator para o tempo de residência de 2,33 h

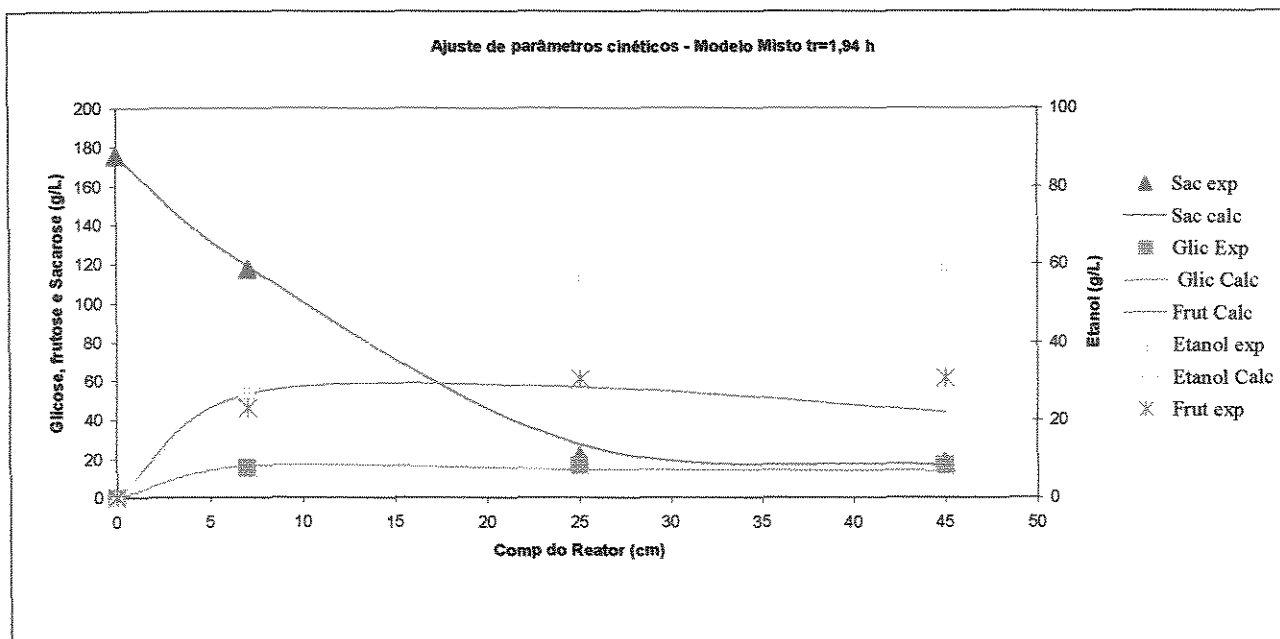


Figura 3.14- Valores de Sacarose (g/L), Glicose, Frutose e Etanol (g/L) experimentais e calculados pelo modelo TOSETTO (2002) em função do comprimento do reator para o tempo de residência de 1,94 h

Observa-se pelas Figuras 3.12 a 3.14 que os ajustes aos dados experimentais para todos os ensaios realizados mostraram um ótimo ajuste ao Modelo TOSETTO (2002), indicando que o mesmo pode ser utilizado para descrever processos fermentativos que utilizam sacarose como substrato e cepas de levedura com alta capacidade hidrolítica (alta concentração de invertase). O termo desenvolvido para descrever o efeito de diauxia devido à glicose mostrou-se bastante satisfatório permitindo um bom ajuste aos dados experimentais.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADMASSU, W.; KORUS, R.A; HEIMSCH, R.C. Ethanol fermentation with a flocculating yeast. Chem. Eng. Journal. V.31, n.1, p.B1-B8, 1985.
- AIBA, S.; SHODA, M.; NAGATAMI, M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. Biotechnol. Bioeng., 10: 845-864, 1968.
- AIBA, S.; SHODA, M. Reassessment of the product inhibition in alcohol fermentation. J. ferment. technol.; 47: 790-794, 1969.

- BAYLEY, J. E.; OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals. 2ª ed. N. York, McGraw-Hill, 1986.
- BAZUA, C. D.; WILKE, C. R. Ethanol effects on the Kinetics of a continuous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Bioeng. Symp., 7: 105-118, 1977.
- BONOMI, A.; ABOUTBOUL, H.; SCHIMITELL, W. Simulation of continuous fermentation of manioc hydrolisate. Biotechnol. Bioeng. Symp.; 11: 333-357, 1981.
- CHEN, C.S; CHAN, E.; GONG, C.S; CHEN, L.F. Effect of sugar consumption on ethanol fermentation in a tower Fermentor packed with self-aggregating yeast: mathematical modeling and bed height. Applied Biochemistry and Biotechnology. V.39, n.40, p.491-508, 1993.
- DOURADO, A.; GOMA, G.; ALBUQUERQUE, U.; SEVELLI, Y. Modelling and static optimization of ethanol production in a cascade reactor. I. Modelling. Biotechnol. Bioeng.; v.29, n.2, p.187-194, 1987.
- GHOSE, T. K.; THYAGI, R. D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolisate I. Batch versus continuous systems. Biotechnol. Bioeng.; v.21, n.8, p.1387-1400, 1979.
- JARZEBSKI, A. B.; MALINOWSKI, J. J.; GOMA, G. Modeling of ethanol fermentation at high yeast concentration. Biotechnol. Bioeng., v.34, n.9, p.1225-1230, 1989.
- JIN, C.K; CHIANG, H.L; WANG, S.S. Enzym.Microbiol.Technol. v.3, p.249, 1981.
- JONES, S.T.; ADMASSU, W.; KORUS, R.A.; HEIMSCH, R.C. Ethanol Fermentation in a Continuous Tower Fermentor. Biotechnol. Bioeng. V.26, n.7, pp.742-747, 1984.
- LEE, C. W.; CHANG, H. N. Kinetics of ethanol fermentation in membrane cell recycle fermentors. Biotechnol. Bioeng., v.29, n.9, p.1105-1112, 1987.
- LEE, J. M.; POLLARD, J. F.; COULMAN, G. A. Ethanol fermentation with cell recycling: computer simulation. Biotechnol. Bioeng., v.25, n.2, p.497-511, 1983.

- LEVENSPIEL, O. Monod equation: a revised and a generalization to product inhibition situations. Biotechnol. Bioeng., v.22, n.8, p.1671-1687, 1980.
- LUONG, J. H. T. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. Biotechnol. Bioeng.; v.27, n.3, p.280-285, 1985.
- MAIORELLA, B.L., BLANCH, H. W., WILKE, C. R. Economic evaluation of alternative ethanol fermentation processes. Biotechnol. Bioeng., v.26, n.9, p.1003-1025, 1984.
- MOULIN, G.; BOZE, H.; GALZY, P. Inhibition of alcoholic fermentation by substrate and ethanol. Biotechnol. Bioeng., v.22, n.11, p.2375-2381, 1980.
- NOVAK, M.; STREHAIANO, P.; MORENO, M.; GOMA, G. Alcoholic fermentation: on the inhibitory effect of ethanol. Biotechnol. Bioeng., v.23, n.1, p.201-211, 1981.
- OLIVEIRA, S.C; PAIVA, T.C.B.; VISCONTI, A.E.S; GIUDICI, R. Discrimination between ethanol inhibition models in a continuous alcoholic fermentation process using flocculating yeast. Applied Biochemistry and Biotechnology. V.74, n.3, pp. 161-172, 1998.
- SCHLEGEL, H. G. *General Microbiology*. Cambridge University Press. 7º ed., p.214, 1990.
- SEVELY, Y.; PORCIEL, J.P.; RAUZY, G.R, BABANS J.P. paper presented at the 8 th Trienal International Congress, Kyoto, Japan, Aug. 1981.
- THATIPAMALA, R.; ROHANI, S.; HILL, G. A. Effects of high product and substrate inhibition on the Kinetics in biomass and products yields during ethanol batch fermentation. Biotechnol. Bioeng.; v.40, n.2, p.289-297, 1992.
- TOSETTO, G.M. Influência da Matéria-Prima no Comportamento Cinético de Levedura na Produção de Etanol. Campinas: FEQ, UNICAMP, 2002. Tese (Mestrado)- Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002.
- VIEGAS, M.C. Desenvolvimento de um Reator de Bancada de Leito Fluidizado para Produção de Etanol Utilizando Linhagens de Leveduras Floculantes. Campinas: FEQ,

UNICAMP, 1999. Tese (Mestrado)- Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999.

VIEGAS, M.C.; ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; Use of tower reactors for continuous ethanol production, Brazilian Journal of Chemical Engineering. v.19, n.02, pp.167-173,2002.

CAPÍTULO 4

OTIMIZAÇÃO OPERACIONAL DO ARRANJO ÓTIMO DE REATORES

ÍNDICE

OBJETIVO	68
1 INTRODUÇÃO	68
1.1 Bioreatores Tipo Torre Utilizando Leveduras Floculantes	68
1.2 Planejamento Fatorial Completo	70
2 MATERIAIS E MÉTODOS	71
2.1 Linhagem	72
2.2 Arranjos de Reatores Testados	73
2.2.1 Arranjo 1	74
2.2.2 Arranjo 2	75
2.2.3 Arranjo 3	76
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
3.1 Otimização Operacional do Arranjo de Reatores	78
3.1.1 Otimização - Arranjo 1	78
3.1.1.1 Rendimento Arranjo 1	79
3.1.1.2 Produtividade Arranjo 1	85
3.1.1.3 Definições da faixa ótima de operação - Arranjo 1	90
3.1.2 Otimização - Arranjo 2	91
3.1.2.1 Rendimento Arranjo 2	92
3.1.2.2 Produtividade Arranjo 2	97
3.1.2.3 Definições da faixa ótima de operação - Arranjo 2	102
3.1.3 Otimização - Arranjo 3	103
3.1.3.1 Rendimento - Arranjo 3	103
3.1.3.2 Produtividade arranjo 3	108
3.1.3.3 Definições da faixa ótima de operação - Arranjo 3	113
3.1.4 Escolha do Melhor Arranjo	113
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115

OBJETIVO

Neste capítulo foi realizada a otimização operacional do sistema proposto, objetivando a obtenção do arranjo ótimo de fermentadores a partir três arranjos distintos compostos cada um de três reatores, onde os ensaios pertencentes a cada arranjo foram realizados segundo o planejamento experimental fatorial e os resultados analisados pelo método de superfície e resposta.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Bioreatores Tipo Torre Utilizando Leveduras Floculantes

Especial atenção tem sido dada a fermentação alcoólica contínua devido as grandes vantagens que este processo apresenta em relação aos processos de fermentação convencionais. Recentemente, muitos processos contínuos têm sido desenvolvidos, tais processos utilizam células de leveduras floculantes e o uso de células de leveduras imobilizadas.

A principal vantagem destes processos é a possibilidade de acúmulo de altas concentrações celulares no interior do fermentador o que aumenta a produtividade do sistema fermentativo, além do fato de reduzir os custos de produção uma vez que tais processos não necessitam de unidades posteriores de separação de células, formadas por centrífugas, equipamentos estes que adicionam custos substanciais de capital e de operação ao processo além da complexidade mecânica causando problemas operacionais que podem ser uma potencial fonte de contaminação microbiológica (PRINCE & BARFORD, 1982).

A produção de etanol utilizando diferentes matérias primas, usando leveduras floculantes, em reatores tipo torre com reciclo tem sido estudado em escala de laboratório com o objetivo de otimizar uma futura aplicação em escala industrial KURIYAMA *et. al.* (1993).

A alta produtividade e estabilidade são alguns dos fatores que são levados em conta quando se trabalha com bioreatores tipo torre utilizando leveduras floculantes, KURIYAMA *et. al.* (1985) trabalhando com um sistema de fermentação contínua com reciclo de células formado

por dois fermentadores e um decantador utilizando leveduras floculantes para produção de etanol, obteve conversão de substrato maior que 98% e produtividade de 26,3 g etanol/ L. h, trabalhando com diferentes concentrações de substrato (125 a 181 g/L) e diferentes condições de aeração num sistema estável por 80 dias operando continuamente. O autor ressalta ainda que tal produtividade é cerca de seis vezes à obtida pelo processo batelada Melle-Boinot.

PRINCE & BARFORD (1982) relatam a capacidade de um fermentador tipo torre operando continuamente por 14 semanas com leveduras floculantes acumular altas concentrações celulares (70-90 g/L), onde produtividade e conversão em etanol são obtidos em função da vazão de alimentação e da concentração de glicose. Outro ponto relevante para a aplicação industrial deste processo que os pesquisadores abrangem neste trabalho é a relação entre a concentração de glicose na alimentação e a concentração dos flocos de leveduras na saída do sistema, uma vez que o aumento da concentração de açúcar na alimentação aumenta a viscosidade do meio fermentativo aumentando assim o carregamento hidráulico de flocos de células.

HARSHBARGER *et. al.* (1995) analisa o impacto econômico da utilização de um bioreator de leito fluidizado de uma planta para produção de etanol comparado a um processo tradicional em batelada. Utilizando-se o bioreator de leito fluidizado operando continuamente com 30% de catalisador v/v e uma concentração de glicose na alimentação de 15% obtem-se um rendimento em etanol de 98% e uma conversão de substrato de 99,5%. No processo tradicional operando com um tempo de fermentação de 24 horas e uma concentração inicial de 15% de glicose obtem-se um rendimento em etanol de 95% e uma conversão de 99,5%. O pesquisador conclui que o custo da planta industrial utilizando-se o bioreator de leito fluidizado é cerca de 17% mais baixo comparado ao processo tradicional.

BU'-LOCK (1983) trabalhando com leveduras floculantes para produção de etanol em sistemas contínuos com reciclo de células de levedura, obteve conversão de substrato maior que 95% e produtividade maior que 25 g Etanol/ L. h, num sistema estável por longo tempo. O sistema trabalhou com caldo de cana-de-açúcar podendo ser implantado nas destilarias, com baixo custo de capital e manutenção.

PAIVA *et al.* (1996) conduzindo uma fermentação alcoólica em bioreator tipo torre com reciclo de células floculantes a uma taxa de diluição constante de $0,20 \text{ h}^{-1}$, obtiveram uma produtividade máxima de 18 g Etanol/L. h, e concentração final de Etanol de 90 g/L era atingida

quando a concentração de substrato era 200 g/L, isto é equivalente a uma conversão de 99% do substrato. Para valores menores de concentração de substrato $S=160$ g/L obteve-se um rendimento máximo de etanol de 90% do máximo valor teórico, e conclui que a alta concentração de células mantidas no reator (aproximadamente 100 g/L base seca) devido a floculação natural das células era responsável pelos valores obtidos muito superiores aos encontrados nas indústrias, favorecendo assim a aplicação do processo proposto.

PRINCE & BARFORD (1982), ressaltam que a configuração dos reatores tipo torre pode ser também um avanço comparado aos sistemas convencionais com respeito ao controle de contaminação microbiológica, uma vez que bactérias presentes no início do processo são rapidamente eliminadas do sistema, uma vez que os contaminantes são “lavados” do reator. Outra vantagem citada é a alta concentração de células de leveduras acumuladas no reator, o que torna o sistema apropriado para operar com altas produtividades.

Apesar da grande disponibilidade de trabalhos em bioreatores de leito fluidizado em escala de bancada poucos estudos na aplicação de métodos de “scale-up” estão disponíveis. ROTTENBACHER *et al.* (1987) propõem um modelo para produção de etanol, baseando-se em dois parâmetros, o tempo de residência e o fornecimento específico de substrato.

1.2 Planejamento Fatorial Completo

O método de otimização por análise de superfície de resposta tem como base o método de planejamento fatorial, e consiste em um grupo de técnicas usadas para o estudo empírico das relações entre uma ou mais respostas medidas e um número de variáveis de entrada que possam ser controladas.

Para aplicar o método de análise de superfície de resposta é necessário primeiramente programar ensaios através de um planejamento fatorial. Este método consiste em selecionar um número fixo de níveis para cada uma das variáveis de entrada. Então se executam experimentos com todas as possíveis combinações. A primeira etapa é usualmente um planejamento fatorial com 2 níveis (nível -1 e nível $+1$) para cada variável. Assim para “n” variáveis envolvidas no estudo, o número de experimentos que deve ser realizado para investigar todas as combinações possíveis é igual a 2^n . Para estimativa do erro experimental associado aos ensaios, são realizados três ensaios no ponto central ou nível 0 (zero)

correspondente às condições intermediárias entre os dois níveis atribuídos a cada variável (BOX *et al.* 1978).

Com os resultados obtidos pelo planejamento é possível calcular os efeitos principais e de interação das variáveis sobre as respostas, determinando assim quais são os efeitos mais significativos, o que possibilita ajustar empiricamente um modelo linear ou de 1º ordem, correlacionando-se as variáveis e as respostas obtidas. Se o modelo de 1º ordem não apresentar uma boa correlação com os dados experimentais é possível complementar o planejamento fatorial inicial realizando-se mais 2^n ensaios distribuídos rotacionalmente (pontos axiais) a uma distância α da condição do ponto central, sendo (α) definido pela equação (4.1) (KHURI & CORNELL, 1987), para obter um modelo quadrático ou de 2º ordem. Onde: n representa o número de variáveis independentes estudadas.

$$\alpha = \sqrt[n]{2^n} \quad (4.1)$$

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para obtenção do arranjo ótimo de fermentadores foram estudados três arranjos distintos compostos cada um de três reatores onde os ensaios pertencentes a cada arranjo foram realizados segundo o planejamento experimental fatorial e os resultados analisados pelo método de superfície e resposta.

A metodologia utilizada nestes ensaios foi a mesma descrita no Capítulo 2 (itens 2.1 a 2.3). Após a inoculação do sistema, onde as concentrações celulares iniciais de cada fermentador eram iguais, foi feita uma fase inicial de retenção e acúmulo de células de leveduras dentro do mesmo conforme descrito no capítulo 2 (item 2.4.1.6). Durante a obtenção dos dados experimentais a concentração de substrato e o tempo de residência em cada ensaio variaram de acordo com o planejamento experimental completo.

Cada fermentação foi monitorada por amostragens periódicas do vinho fermentado em cada um dos três fermentadores, do meio concentrado e do efluente onde se determinou em cada uma delas a concentração de ART, concentração de etanol e a altura e estabilidade do leito de células formado. No início e no término de cada ensaio era realizada a pesagem

do frasco contendo o meio concentrado e do efluente obtendo-se assim pela diferença de peso o que realmente foi consumido de substrato e produzido de etanol no término de cada ensaio. A partir destes dados foi feito o balanço de massa do sistema onde foram calculados o rendimento e a produtividade do sistema para cada ensaio. Antes de se mudar as condições para a realização de um novo ensaio tomou-se o cuidado de que o regime estacionário tivesse sido atingido.

Os ensaios correspondentes a cada arranjo estudado foram realizados de acordo com o planejamento experimental fatorial de forma aleatória. Assim foram realizados aleatoriamente 2^2 ensaios para verificação de um modelo de 1º ordem, três ensaios no ponto central para obtenção do erro experimental e mais 4 ensaios distribuídos rotacionalmente (equação 4.1), totalizando-se onze ensaios para cada arranjo.

As variáveis independentes estudadas ($n=2$) em cada ensaio foram a concentração de substrato na alimentação S (150 a 200 g/L) e o tempo de residência tr (3 a 4 hora). As variáveis resposta foram: (a) rendimento (%) e a produtividade do sistema (g Etanol/L.h) que foram respectivamente calculadas utilizando-se as equações (4.2) e (4.3).

$$Rend = \frac{[E \text{ tan ol} (^{\circ}GL)] * 1000}{[ART_{ent}] * 0,6475} \quad (4.2)$$

$$Prod = D * [E \text{ tan ol} (^{\circ}GL)] * 10 \quad (4.3)$$

Onde:

D = Taxa de diluição h^{-1} (1/tempo de residência)

0,6475 corresponde ao fator estequiométrico

$[ART_{ent}]$ = ART (Açúcares redutores totais que entra no sistema

$[Etanol (^{\circ}GL)]$ = Concentração final de etanol em $^{\circ}GL$ (%v/v)

2.1 Linhagem

A cepa de levedura utilizada nos ensaios do arranjo ótimo foi uma linhagem de *Saccharomyces sp* isolada da unidade de fermentação industrial da Destilaria JUNQUEIRA

(Igarapava/SP) durante a safra de 2000, selecionada dentre outras isoladas de processos industriais conforme descrito no Capítulo 02.

2.2 Arranjos de Reatores Testados

Com o objetivo de operar um sistema de fermentação alcoólica com altas produtividades mantendo o rendimento em etanol compatível aos níveis industriais, sem a necessidade de se utilizar unidade de separação de células (centrífuga), visando assim à redução do custo de produção do etanol em torno de 15%, foi realizada a otimização operacional do sistema proposto, visando a obtenção de um arranjo ótimo de fermentação constituído de três reatores tipo torre para produção de etanol utilizando leveduras com características floculantes.

VIEGAS (2002) trabalhando com um sistema constituído por 2 reatores em série com leveduras floculantes destaca como ponto relevante a diminuição do volume de leito de células formado no primeiro reator quando altas taxas de alimentação de substrato são aplicados. Este fato é decorrente da grande quantidade de CO₂ liberado por unidade de tempo, que ocorre nestas condições. Apesar do aumento da produtividade em um primeiro momento, esta liberação de CO₂ pode acarretar em uma diminuição da concentração de células no primeiro reator o que provoca uma queda no rendimento fermentativo no decorrer do tempo. Deve-se, portanto tomar cuidado ao se adotar condições de operação que possam levar a valores de produtividade muito elevados, para que não haja desestabilização operacional do sistema.

Nesta etapa foram testados a performance de três arranjos constituídos cada um por três reatores interligados, originando sistemas de reatores que operam com alta produtividade e rendimentos em etanol satisfatórios. A escolha dos arranjos a serem estudados foi fundamentada na necessidade de se utilizar sistemas que contribuam para a estabilidade do leito de leveduras formado durante o processo de fermentação, uma vez que segundo VIEGAS (2002) este é o principal fator para se operar sistemas de fermentação alcoólica com reatores tipo torre sem a necessidade de se utilizar separadoras centrífugas.

2.2.1 Arranjo 1

Este arranjo é constituído de um sistema composto por três reatores ligados em série, onde vinho fermentado proveniente do primeiro reator alimentou o segundo e o vinho proveniente deste alimentou o terceiro reator. A Figura 4.1 mostra um esquema do arranjo 1.

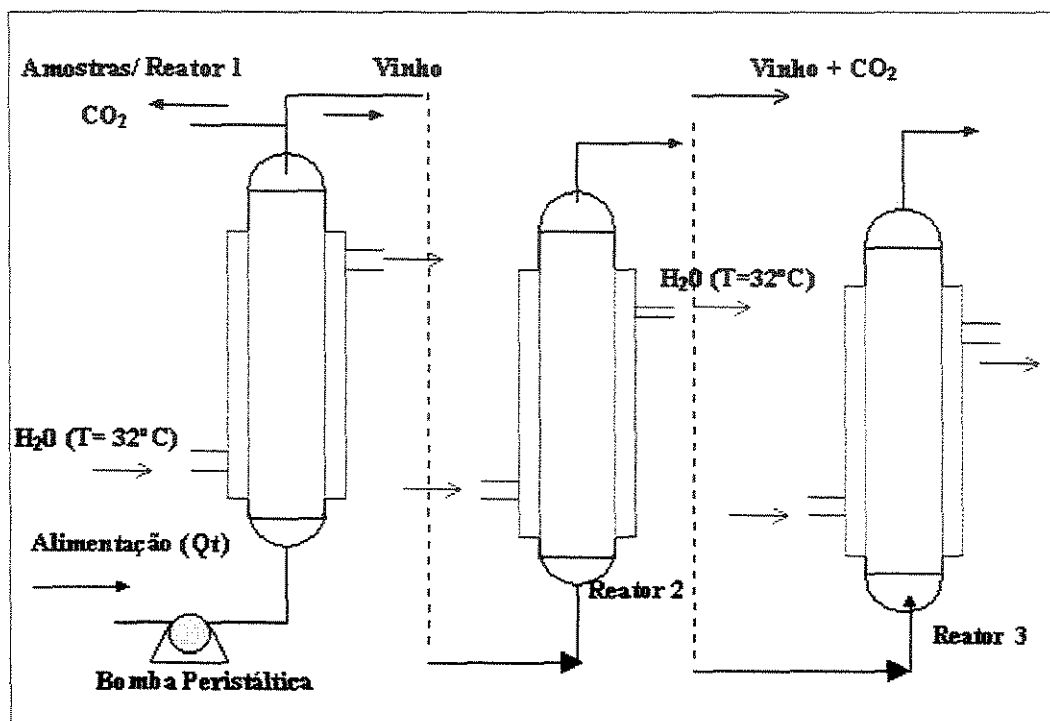


Figura 4.1- Esquema de Fermentadores -Arranjo 1

O objetivo de se estudar este arranjo é eliminar o efeito da inibição pelo produto devido às altas concentrações de etanol proveniente do reator 1, uma vez que o tempo de residência em cada reator é baixo, fazendo que o etanol formado percorra rapidamente o sistema, acarretando uma maior concentração de substrato para ser convertido no reator 3. Como toda a alimentação é feita no reator 1 a desestabilização do leito neste reator tende a ser maior que nos reatores 2 e 3. Espera-se neste arranjo que o sistema como um todo se comporte como um reator “plug-flow”, com retirada de CO_2 entre cada reator.

2.2.2 Arranjo 2

Este arranjo é constituído de um sistema composto de três reatores, sendo que os dois primeiros são ligados em paralelo cuja vazão de alimentação em cada reator é 50% da vazão total. O vinho fermentado proveniente destes reatores alimentou um terceiro reator que está ligado em série com os dois primeiros.

O objetivo de se estudar este arranjo é dividir a taxa de aplicação total (g de substrato/ h) entre os reatores 1 e 2, diminuindo assim a formação de CO₂ nestes reatores o que contribui para manter a estabilidade operacional do leito de leveduras formado nos mesmos, além de aumentar o tempo de residência do substrato nos reatores 1 e 2, o reator 3 que recebe o efluente dos reatores 1 e 2 tem um tempo de residência bem menor auxiliando assim a reduzir o efeito da inibição do produto devido as altas concentrações de etanol proveniente dos reatores 1 e 2. A Figura 4.2 esquematiza o arranjo 2.

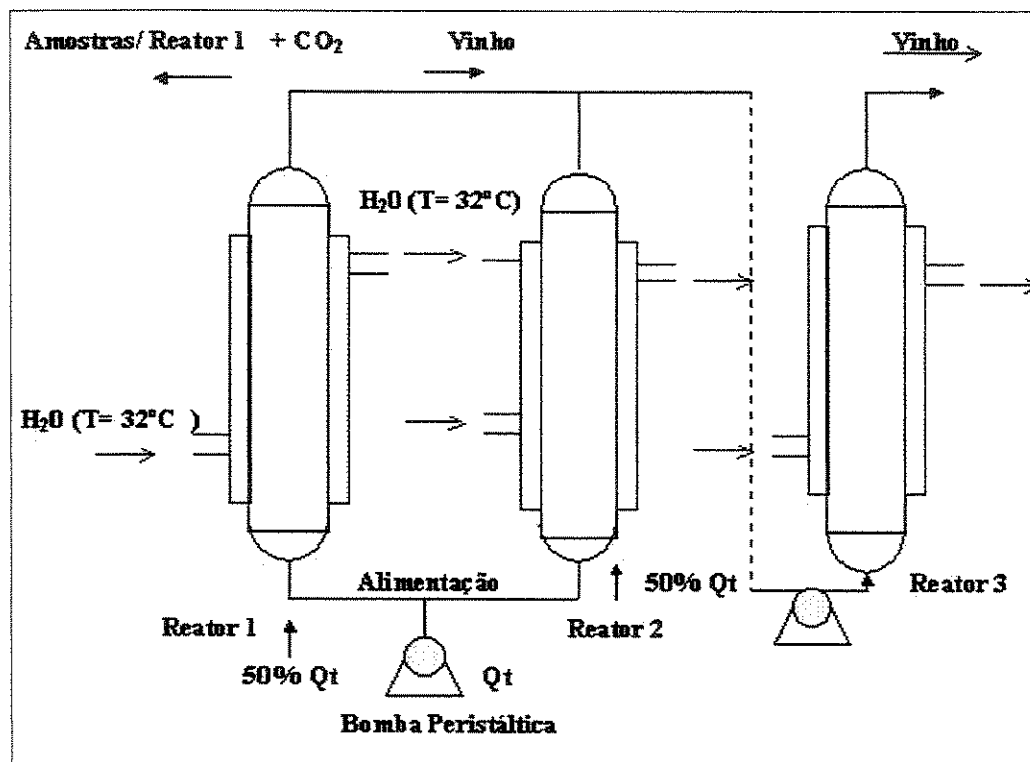


Figura 4.2- Esquema de Fermentadores -Arranjo 2.

2.2.3 Arranjo 3

Este arranjo é constituído de três reatores ligados em série sendo que o primeiro reator recebeu metade da alimentação total, o efluente proveniente deste alimentou o segundo reator juntamente com a outra metade da alimentação, o efluente proveniente do segundo reator alimentou o terceiro reator.

O objetivo de se estudar este arranjo é dividir a taxa de aplicação total (g de substrato/ h) entre os reatores 1 e 2, diminuindo assim a formação de CO_2 nestes reatores o que contribui para manter a estabilidade operacional do leito de leveduras formado além de amenizar os efeitos de inibição pelo produto nos reatores 2 e 3. A Figura 4.3 mostra um esquema do arranjo 3.

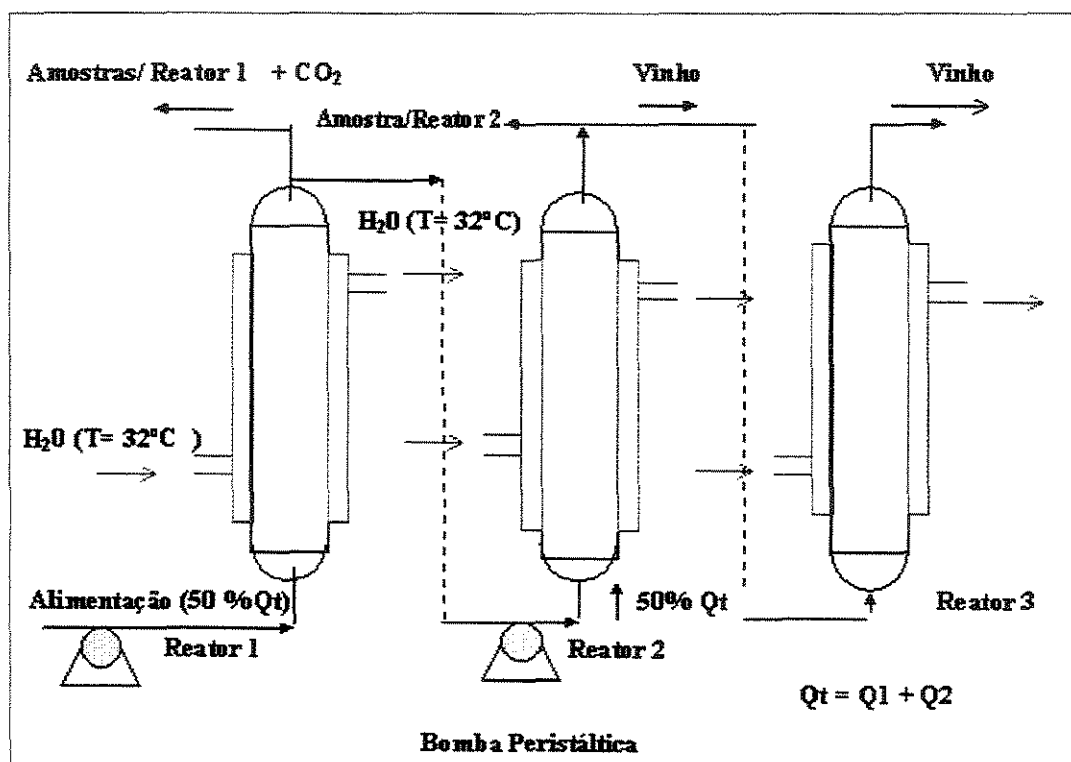


Figura 4.3- Esquema de Fermentadores -Arranjo 3

A Tabela 4.1 apresenta as condições de cada ensaio realizado em cada arranjo estudado. O valor do ponto central 3,5 h em relação a variável tempo de residência (t_r) foi escolhido por ser um valor compatível com as condições operacionais dos processos industriais. A escolha do valor do ponto central 175,00 g/L da variável concentração de

substrato (S) se deve ao fato de que concentrações de etanol em torno de 9 °GL são obtidas, valores estes compatíveis com níveis industriais.

Tabela 4.1- Ensaios realizados no planejamento fatorial completo, onde: S-Concentração de substrato (g/L) e tr-tempo de residência do substrato no sistema (h)

Ensaio	S (g/L)	tr (h)	S (g/L)	tr (h)
Valores Codificados		Valores Decodificados		
1	-1,00	-1,00	150,00	3,00
2	-1,00	+1,00	150,00	4,00
3	+1,00	-1,00	200,00	3,00
4	+1,00	+1,00	200,00	4,00
5	$-\alpha$	0	140,00	3,50
6	α	0	210,00	3,50
7	0	$-\alpha$	175,00	2,80
8	0	α	175,00	4,20
9 (C)	0	0	175,00	3,50
10 (C)	0	0	175,00	3,50
11 (C)	0	0	175,00	3,50

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Otimização Operacional do Arranjo de Reatores

3.1.1 Otimização - Arranjo 1

A Tabela 4.2 mostra os resultados experimentais dos testes obtidos no arranjo 1, onde os valores da rendimento e produtividade do sistema foram obtidas pelas equações (4.2) e (4.3) respectivamente.

Tabela 4.2- Ensaios realizados no planejamento fatorial linear, onde: S-Concentração de substrato (g/L) e tr - tempo de residência do substrato no sistema (h) - Arranjo 1

Caso	S (g/L)	tr (h)	S (g/L)	tr (h)	Produtividade (g Etanol/L.h)	Rendimento (%)
Valores Codificados			Valores Decodificados			
1	-1,00	-1,00	150,00	3,00	21,09	84,85
2	-1,00	+1,00	150,00	4,00	14,67	94,56
3	+1,00	-1,00	200,00	3,00	24,41	88,98
4	+1,00	+1,00	200,00	4,00	20,79	86,89
5	$-\alpha$	0	140,00	3,50	16,32	93,20
6	α	0	210,00	3,50	25,32	87,18
7	0	$-\alpha$	175,00	2,80	28,20	88,50
8	0	α	175,00	4,20	19,71	91,60
9 C	0	0	175,00	3,50	20,78	93,10
10 C	0	0	175,00	3,50	21,01	92,75
11 C	0	0	175,00	3,50	21,13	93,32

Com base nos resultados contidos na Tabela 4.2 foram estudados os efeitos das variáveis independentes sobre o rendimento e a produtividade do sistema proposto no arranjo 1.

3.1.1.1 Rendimento Arranjo 1

A partir dos dados contidos na Tabela 4.2 e utilizando o “Software Statistica 5.0” obteve-se os valores dos efeitos principais e os de interação de cada variável para o rendimento. A Tabela 4.3 mostra os valores dos efeitos principais juntamente com os efeitos de interação de cada variável estudada.

Tabela 4.3- Estimativa dos efeitos principais e de interação sobre o rendimento – Arranjo 1 (L é o coeficiente do termo linear e Q é o coeficiente do termo quadrático)- Erro puro = 0,082

Fator	Efeito	Erro Padrão
Média	93,05*	0,16*
(1) S (L)	-3,01*	0,20*
(2) tr (L)	3,00*	0,20*
S (Q)	-3,51*	0,24*
tr (Q)	3,65*	0,24*
1L * 2L	-5,89*	0,28*

*valores significativos (no nível de 95%); $R^2=0,9258$ Grau de Ajuste =0,8517.

Pode-se perceber pelos dados contidos na Tabela 4.3 que ao variar a concentração de substrato (S) de 150,00 g/L para 200,00 g/L a variável resposta, o rendimento diminui em média 3,01%. Para o tempo de residência, quando passa do nível -1 (3 h) para +1 (4 h), o rendimento sofre um aumento de 3,00%.

Sendo o princípio do planejamento uma análise multivariável, é possível avaliar o efeito da interação entre as variáveis. Isto significa que ao variar a concentração de substrato de -1 para +1, a mudança na resposta pode não ser a mesma, pois esta depende da variação do tempo de residência. Na Tabela 4.3, isto pode ser verificado através do efeito de interação, que corresponde ao último valor apresentado.

A importância dos efeitos principais juntamente com os efeitos de interação podem ser melhor visualizados pelo gráfico de Pareto (Figura 4.4), que mostra uma estimativa dos

efeitos de cada variável estatisticamente significativa no nível de confiança de 95% (valores absolutos).

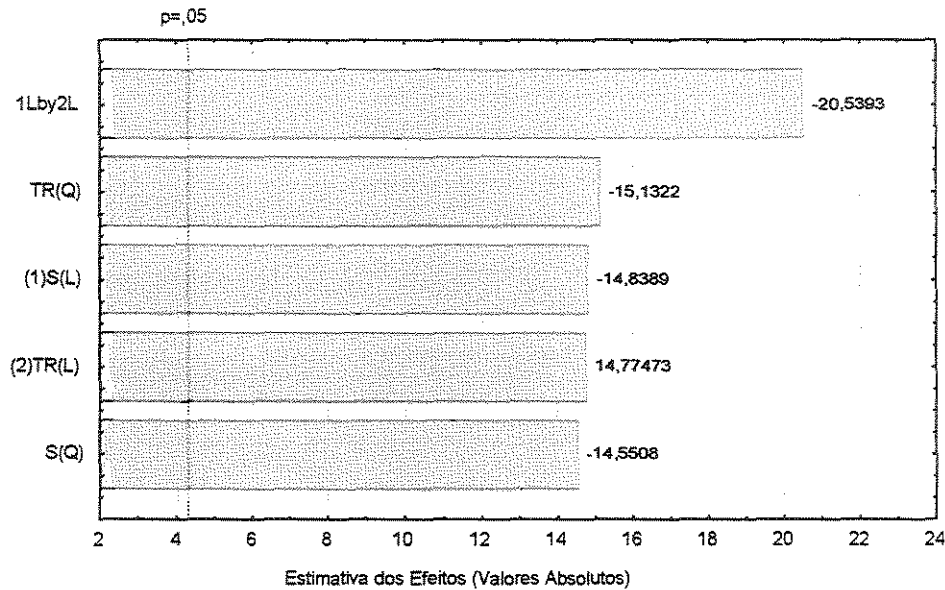


Figura 4.4- Gráfico de Pareto (Rendimento Arranjo 1)

Pela Figura 4.4 pode-se perceber que os efeitos mais significativos no intervalo de confiança de 95% foram o termo de interação entre o tempo de residência e concentração de substrato na alimentação. Este fato está relacionado à alimentação neste arranjo ter sido feita integralmente no reator 1, acarretando numa maior desestabilização do leito formado neste reator, fazendo com que as mudanças que ocorrem no termo de interação, que é fisicamente definida pela taxa de aplicação (g de substrato na alimentação/ h) seja mais relevante para o rendimento, quando o sistema é submetido a altas taxas de aplicação.

O fato do termo de interação entre o tempo de residência e concentração de substrato na alimentação ser o termo que apresenta maior significância estatística neste arranjo e ter valor negativo, significa que o mesmo tem um efeito contrário ao rendimento, o que era esperado uma vez que altas taxas de aplicação diminuem a estabilidade do leito de células formado, reduzindo assim o rendimento obtido.

O modelo codificado obtido pela regressão que relaciona o rendimento do sistema com a concentração de substrato na alimentação e o tempo de residência, é a equação de 2º ordem descrita matematicamente pela equação (4.4).

$$Rend = 93,05 - 1,51 * S + 1,50 * tr - 1,76 * S^2 + 1,83 * tr^2 - 2,95 * S * tr \quad (4.4)$$

A Tabela 4.4 (Tabela ANOVA) faz uma avaliação do desempenho do modelo obtido, onde a percentagem de variação explicada (R^2) é dada pela equação (4.5).

$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_T} \quad (4.5)$$

Onde:

SQ_R = Soma Quadrática da Regressão

SQ_T = Soma Quadrática Total

No modelo em estudo obteve-se um valor de R^2 igual a 0,9258, o que significa que 92,58 % das variações nos resultados obtidos podem ser explicados pelo modelo empírico.

Tabela 4.4- ANOVA para o rendimento -Arranjo 1 (p = N.º de parâmetros do modelo obtido, n = N.º total de ensaios, m = N.º de ensaios distintos, g.l = graus de liberdade)

Fonte de Variação	S.Q	g.l	M.Q	Teste F	R^2
Regressão	99,03	p-1=5	19,81	12,53	0,9258
Resíduos	7,93	n-p=5	1,58		
F.Ajuste	7,77	m-p=3	2,59		
E.Puro	0,16	n-m=2	0,08		
Total	106,96	n-1=10			

$F_{5,5} = 5,05$ (tabelado no nível de 95%)

De modo a verificar se o modelo explica uma quantidade significativa da variação nos dados experimentais, pode-se utilizar o teste F de significância. Para isto, compara-se o valor de F estimado a partir dos dados experimentais com o valor tabelado de uma distribuição de frequência de referência $F_{p-1, n-1}$.

Como o valor tabelado de F para o intervalo de 95% de confiança foi de 5,05 (BRUNS *et. al.*, 1996), valor este 3,92 vezes inferior ao valor obtido com o modelo, pode-se

afirmar que a quantidade de variação devido ao modelo é significativamente maior que a variação não explicada, atestando assim a validade do modelo obtido.

A precisão adequada do modelo pode ser melhor visualizada pela Figura 4.5, onde são apresentados os valores observados experimentalmente versus os previstos pelo modelo.

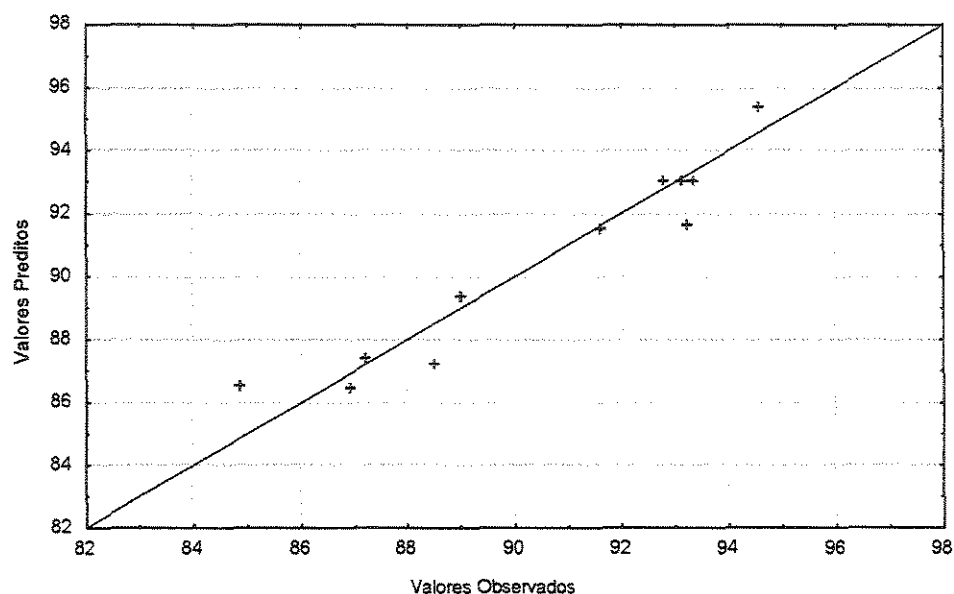
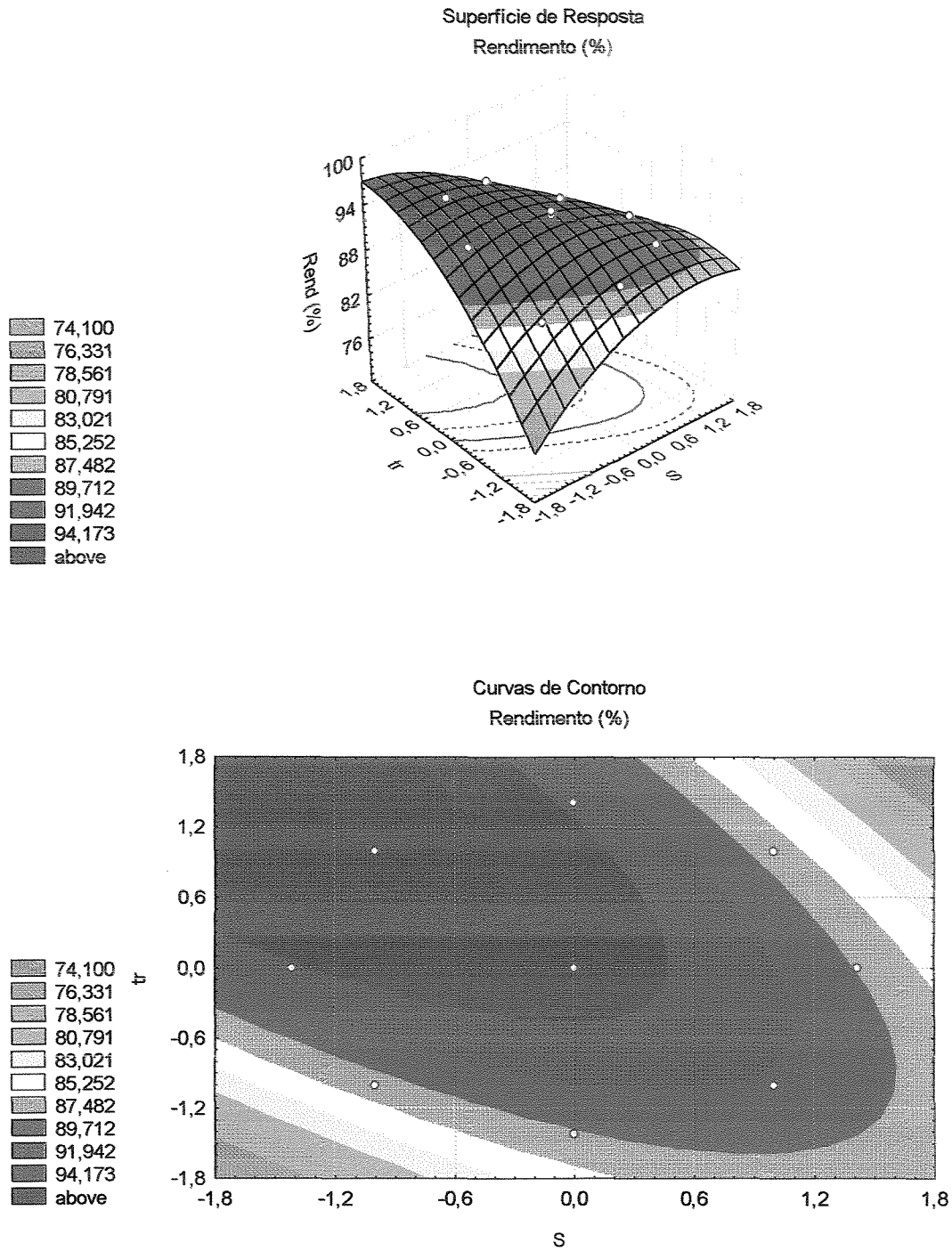


Figura 4.5- Valores Preditos versus observados (Rendimento Arranjo 1)

Assim, sendo o modelo quadrático válido, é possível gerar as superfícies de resposta e as curvas de contorno que serão analisadas para definir as faixas ótimas de operação para otimização do rendimento do sistema proposto pelo arranjo 1.

As Figuras 4.6 a e 4.6 b apresentam respectivamente a superfície de resposta e as curvas de contorno para o rendimento em função da concentração de substrato e do tempo de residência.



Figuras 4.6 a e 4.6 b - Superfície de Resposta e Curvas de Contorno (Rendimento arranjo 1)

Pelas Figuras 4.6 a e 4.6 b percebe-se que quanto menor a concentração de substrato e maior o tempo de residência maior é o rendimento, e que o rendimento tende ao máximo quando se opera o sistema com baixas concentrações de substrato na alimentação e tempos de residência elevados.

3.1.1.2 Produtividade Arranjo 1

Após o estudo dos efeitos das variáveis estudadas sobre o rendimento partiu-se para a otimização da produtividade. Para o planejamento fatorial foi utilizada a mesma sequência de ensaios apresentados na Tabela 4.2.

Na Tabela 4.5 são apresentados os efeitos principais de cada variável e os efeitos de interação dos efeitos significativos estatisticamente sobre a produtividade.

Tabela 4.5- Estimativa dos efeitos principais e de interação sobre o produtividade – Arranjo 1 (L é o coeficiente do termo linear e Q é o coeficiente do termo quadrático).

Fator	Efeito	Erro Padrão
Média	20,97*	0,10*
(1) S (L)	5,54*	0,12*
(2) tr (L)	-5,51*	0,12*
S (Q)	-1,22*	0,15*
tr (Q)	1,90*	0,15*
1L * 2L	1,40*	0,18*

*valores significativos (no nível de 95%); $R^2=0,9238$ Grau de Ajuste =0,8478.

Pode perceber pelos dados apresentados na tabela 4.5 que a concentração de substrato na alimentação apresentou uma influência positiva sobre a produtividade enquanto que o tempo de residência apresentou uma influência negativa. Isto significa, que ao variar a concentração de substrato (S) de 150,00 g/L para 200,00 g/L a variável resposta, a produtividade aumenta em média 5,54 g Etanol/ L . h. A mesma avaliação pode ser feita para o tempo de residência (tr), quando passa do nível -1 (3 h) para +1 (4 h), provoca uma queda de 5,51 g Etanol/ L . h na produtividade do sistema.

A importância dos efeitos principais juntamente com os efeitos de interação podem ser melhor visualizados pelo gráfico de Pareto (Figura 4.7), que mostra uma estimativa dos efeitos de cada variável estatisticamente significativa (valores absolutos).

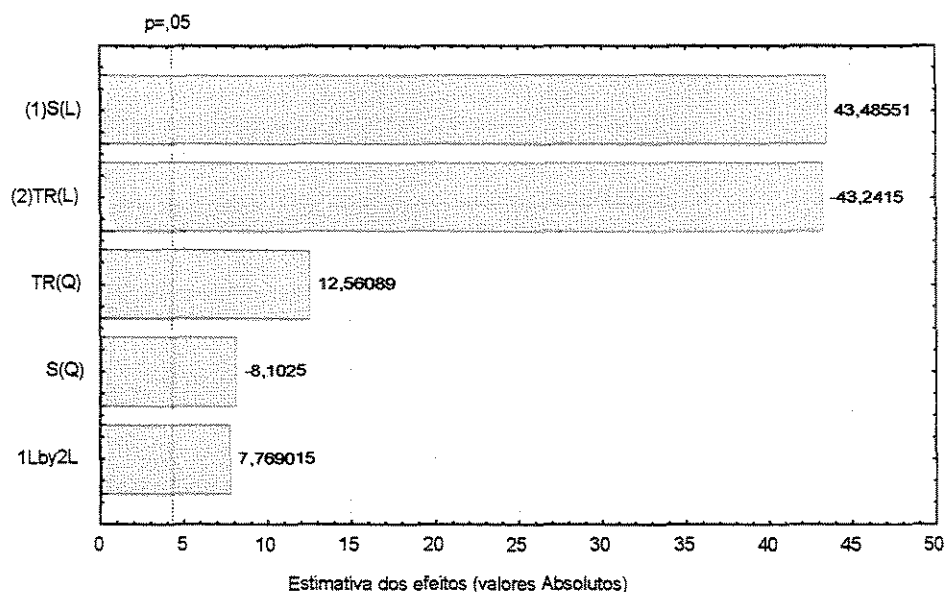


Figura 4.7 - Gráfico de Pareto (Produtividade Arranjo 1)

Pela Figura 4.7 pode-se perceber que os efeitos mais significativos no intervalo de confiança de 95% são o tempo de residência (linear) e a concentração de substrato (linear) na alimentação.

Contrário ao rendimento o termo de interação entre a concentração de substrato e o tempo de residência (taxa de aplicação) foi o termo de menor importância, uma vez que a produtividade depende da concentração de substrato, do tempo de residência e da concentração de etanol, não dependendo da conversão de substrato como o rendimento.

O modelo codificado obtido pela regressão que relaciona a produtividade com a concentração de substrato na alimentação e o tempo de residência é a equação de 2º ordem descrita matematicamente pela equação (4.6).

$$Pr od = 20,97 + 2,77 * S - 2,75 * tr - 0,61 * S^2 + 0,95 * tr^2 + 0,70 * S * tr \quad (4.6)$$

A Tabela 4.6 (Tabela ANOVA) faz uma avaliação do desempenho do modelo, onde a percentagem de variação explicada (R^2) é dada pela equação (4.5).

No modelo em estudo obteve-se um valor de R^2 igual a 0,9238, o que significa que 92,38 % das variações nos resultados obtidos podem ser explicados pelo modelo empírico.

Tabela 4.6- ANOVA para o produtividade –Arranjo 1 ($p = N.^{\circ}$ de parâmetros do modelo obtido, $n = N.^{\circ}$ total de ensaios, $m = N.^{\circ}$ de ensaios distintos, g.l = graus de liberdade).

Fonte de Variação	S.Q	g.l	M.Q	Teste F	R^2
Regressão	134,26	$p-1=5$	26,85	12,15	0,9238
Resíduos	11,05	$n-p=5$	2,21		
F.Ajuste	10,99	$m-p=3$	3,66		
E.Puro	0,06	$n-m=2$	0,03		
Total	145,31	$n-1=10$			

$F_{5,5} = 5,05$ (tabelado no nível de 95%)

Como o valor tabelado de F para o intervalo de 95% de confiança foi de 5,05 (BRUNS *et. al.*,1996), valor este 2,40 vezes inferior ao valor obtido com o modelo, pode-se afirmar que a quantidade de variação devido ao modelo é significativamente maior que a variação não explicada, atestando assim a validade do modelo obtido.

A precisão adequada do modelo pode ser melhor visualizada pela Figura 4.8, onde são apresentados os valores de produtividade obtidos experimentalmente versus os previstos pelo modelo.

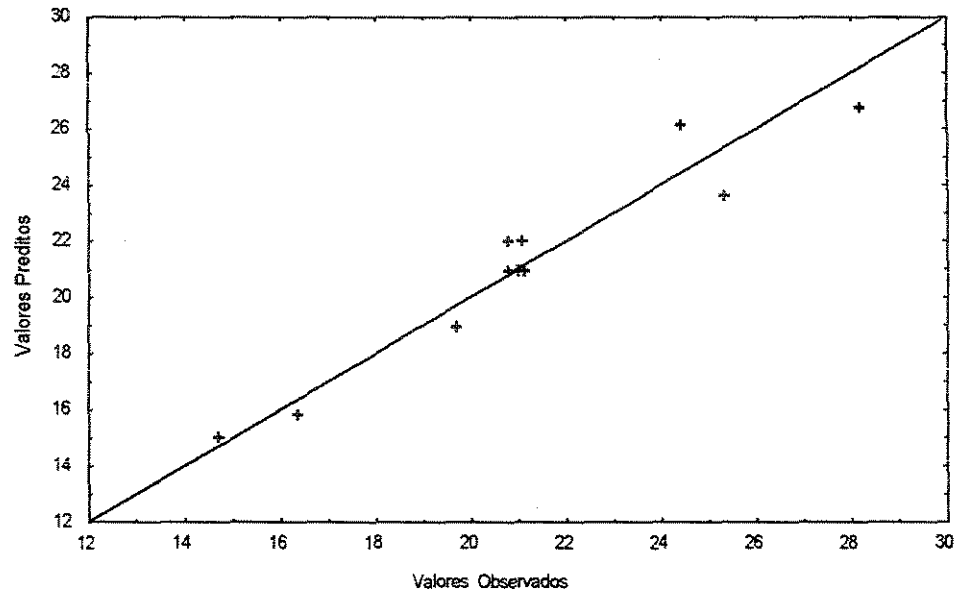
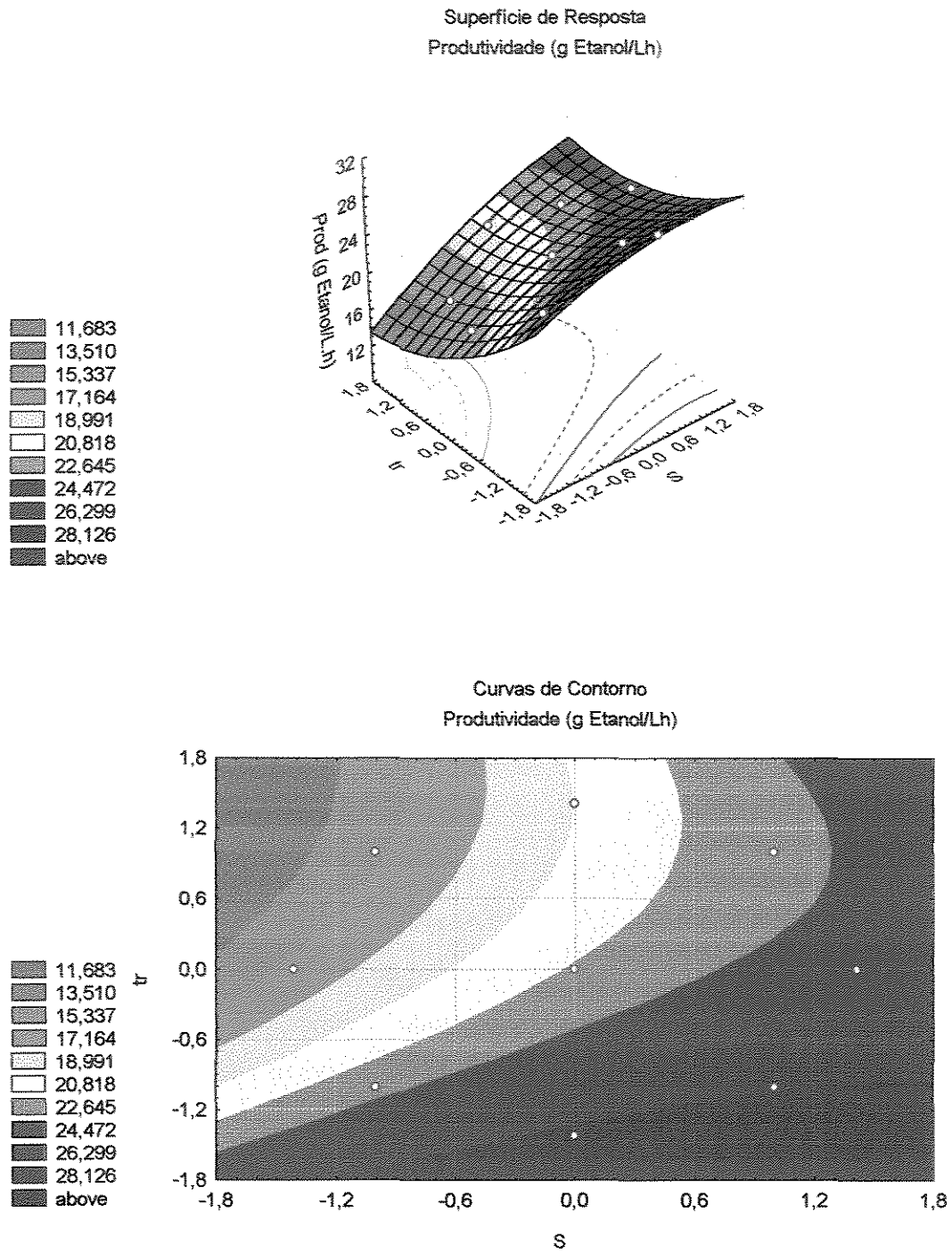


Figura 4.8- Valores Preditos versus observados (Produtividade -Arranjo 1)

Assim, sendo o modelo quadrático válido, é possível gerar as superfícies de resposta e as curvas de contorno que serão analisadas para definir as faixas ótimas de operação para otimização da produtividade do sistema proposto no arranjo 1.

As Figuras 4.9 a e 4.9 b apresentam respectivamente a superfície de resposta e as curvas de contorno para a produtividade em função da concentração de substrato e do tempo de residência.



Figuras 4.9 a e 4.9 b - Superfície de resposta e curvas de contorno (Produtividade arranjo 1)

Pelas Figuras 4.9 a e 4.9 b verifica-se que a produtividade apresenta um comportamento antagônico em relação ao rendimento, ou seja, quanto maior a concentração de substrato e menor o tempo de residência maior será a produtividade do sistema.

3.1.1.3 Definições da faixa ótima de operação - Arranjo 1

Para definir o ponto ótimo de operação deve-se levar em conta a importância do rendimento, ou seja, deve-se buscar obter a maior produtividade possível sem que o valor do rendimento seja afetado. Como era esperado o comportamento dos valores de rendimento e produtividade em função da concentração de substrato e tempo de residência se mostraram antagônicos. Desta forma é necessária a análise das superfícies de ambas as respostas para se definir o ponto ótimo de operação.

Ao analisar as Figuras 4.6.a e 4.6.b, observa-se que o rendimento tende ao máximo para baixas concentrações de substrato e altos tempos de residência.

Valores satisfatórios de rendimento fermentativo (91,00%) podem ser atingidos na faixa que varia de 130-200 g/L de substrato com 3,0 a 3,6 horas de tempo de residência. Para se obter o valor ótimo de operação, buscou-se a produtividade máxima contida nesta faixa.

Pelas Figuras 4.9.a e 4.9.b é possível obter dentro da faixa pré-estabelecida a máxima produtividade 26,29 g Etanol/ L. h para valores de 170 g/L de substrato e 3,0 horas de tempo de residência até 200 g/L de substrato e 3,0 horas de tempo de residência. Levando-se em conta que a concentração de etanol no vinho é função da concentração de ART para um mesmo rendimento e considerando a necessidade de se obter a maior concentração alcoólica possível, optou-se por trabalhar no ponto que corresponde a 180 g/L de ART (o que resulta numa concentração final de etanol em torno de 10,00 °GL, considerando rendimento 90%) e 3,0 horas de tempo de residência.

3.1.2 Otimização - Arranjo 2

A Tabela 4.7 mostra os resultados experimentais dos testes obtidos no arranjo 2, , onde os valores da rendimento e produtividade do sistema foram obtidas pelas equações (4.2) e (4.3) respectivamente.

Tabela 4.7- Ensaios realizados no planejamento fatorial linear, onde: S-Concentração de substrato (g/L) e tr-tempo de residência do substrato no sistema (h) - Arranjo 2.

Caso	S (g/L)	tr (h)	S (g/L)	tr (h)	Produtividade (g Etanol/L. h)	Rendimento (%)
Valores Codificados		Valores Decodificados				
1	-1,00	-1,00	150,00	3,00	23,45	87,00
2	-1,00	+1,00	150,00	4,00	15,66	94,09
3	+1,00	-1,00	200,00	3,00	24,69	82,78
4	+1,00	+1,00	200,00	4,00	23,12	84,45
5	$-\alpha$	0	140,00	3,50	17,97	91,36
6	α	0	210,00	3,50	22,00	86,00
7	0	$-\alpha$	175,00	2,80	24,34	83,24
8	0	α	175,00	4,20	20,82	90,11
9 C	0	0	175,00	3,50	21,77	85,01
10 C	0	0	175,00	3,50	22,68	84,44
11 C	0	0	175,00	3,50	22,17	84,78

Com base nos resultados contidos na Tabela 4.7 foram estudados os efeitos das variáveis independentes sobre o rendimento e a produtividade do sistema proposto no arranjo 2

3.1.2.1 Rendimento Arranjo 2

A partir dos dados contidos na Tabela 4.7 e utilizando o “Software Statistica 5.0” obteve-se os valores dos efeitos principais e os de interação de cada variável para o rendimento. A Tabela 4.8 mostra os valores dos efeitos principais juntamente com os efeitos de interação de cada variável estudada.

Tabela 4.8- Estimativa dos efeitos principais e de interação sobre o rendimento – Arranjo 2 (L é o coeficiente do termo linear e Q é o coeficiente do termo quadrático).

Fator	Efeito	Erro Padrão
Média	84,74*	0,16*
(1) S (L)	-5,36*	0,20*
(2) tr (L)	4,62*	0,20*
S (Q)	3,64*	0,24*
Tr (Q)	1,63*	0,24*
1L * 2L	-2,71*	0,28*

*valores significativos (no nível de 95%); $R^2=0,9553$ Grau de Ajuste =0,9105.

Os três primeiros efeitos da Tabela 4.8 correspondem aos efeitos principais das variáveis, que é a média dos efeitos na resposta devido a mudança da variável da faixa de -1 para +1. Isto significa que ao variar a concentração de substrato (S) de 150,00 g/L para 200,00 g/L a variável resposta, no caso o rendimento diminui em média 5,36%. Para o tempo de residência, quando passa do nível -1 (3 h) para +1 (4 h), o rendimento sofre um aumento de 4.62%.

A importância dos efeitos principais juntamente com os efeitos de interação podem ser melhor visualizados pelo gráfico de Pareto (Figura 4.10), que mostra uma estimativa dos efeitos de cada variável estatisticamente significativa no nível de confiança de 95% (valores absolutos).

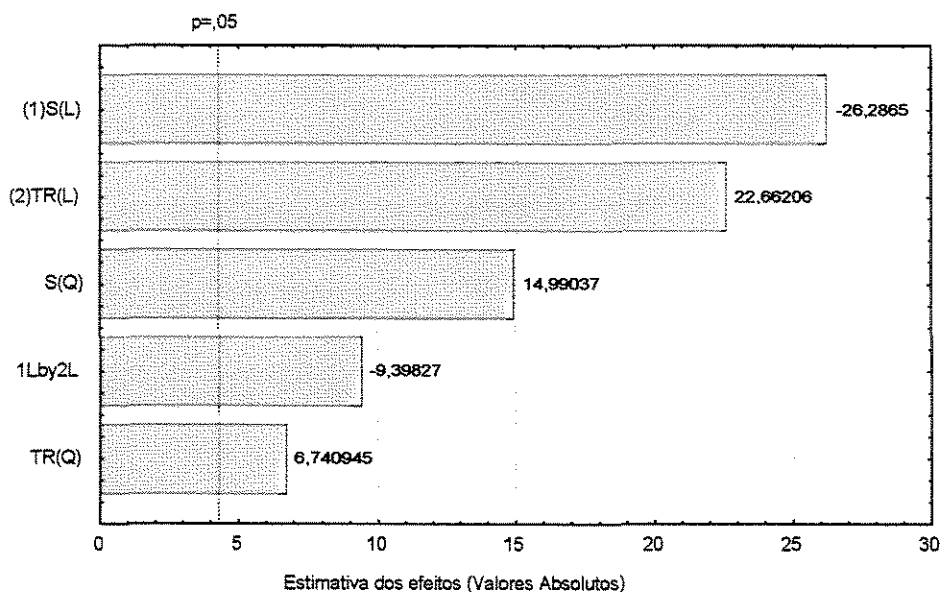


Figura 4.10- Gráfico de Pareto (Rendimento Arranjo 2)

Pela Figura 4.10 pode-se perceber que os efeitos mais significativos no intervalo de confiança de 95% são o tempo de residência (linear) e a concentração de substrato (linear) na alimentação.

Ao se comparar a Figura 4.10 com a Figura 4.4 pode-se perceber que para o arranjo 2, o efeito do termo de interação entre as variáveis independentes não foi tão significativa assim como foi para o arranjo 1, isto se deve ao fato de que no arranjo 2 a alimentação foi dividida igualmente entre os reatores 1 e 2, minimizando assim a desestabilização do leito de célula formado quando o sistema opera com altas taxas de aplicação (g de substrato na alimentação/h).

O modelo codificado obtido pela regressão que relaciona o rendimento do sistema com a concentração de substrato na alimentação, o tempo de residência, é a equação de 2º ordem descrita matematicamente pela equação (4.7).

$$Rend = 84,74 - 2,67 * S + 2,31 * tr + 1,81S^2 + 0,81tr^2 - 1,35 * S * tr \quad (4.7)$$

A Tabela 4.9 (Tabela ANOVA) faz uma avaliação do desempenho do modelo obtido, onde a percentagem de variação explicada (R^2) é dada pela equação (4.5).

No modelo em estudo obteve-se um valor de R^2 igual a 0,9553, o que significa que 95,53 % das variações nos resultados obtidos podem ser explicados pelo modelo empírico.

Tabela 4.9- ANOVA para o rendimento -Arranjo 2 ($p = N.^{\circ}$ de parâmetros do modelo obtido, $n = N.^{\circ}$ total de ensaios, $m = N.^{\circ}$ de ensaios distintos, g.l = graus de liberdade).

Fonte de Variação	S.Q	g.l	M.Q	Teste F	R^2
Regressão	126,66	$p-1=5$	25,33	21,35	0,9552
Resíduos	5,93	$n-p=5$	1,19		
F.Ajuste	5,76	$m-p=3$	1,92		
E.Puro	0,16	$n-m=2$	0,08		
Total	132,60	$n-1=10$			

$F_{5,5}=5,05$ (tabelado no nível de 95%)

Como o valor tabelado de F para o intervalo de 95% de confiança foi de 5,05 (BRUNS *et. al.*,1996), valor este 4,22 vezes inferior ao valor obtido com o modelo, pode-se afirmar que a quantidade de variação devido ao modelo é significativamente maior que a variação não explicada, atestando assim a validade do modelo obtido.

A precisão adequada do modelo pode ser melhor visualizada pela Figura 4.11, onde são apresentados os valores observados experimentalmente versus os previstos pelo modelo obtido (equação 4.7).

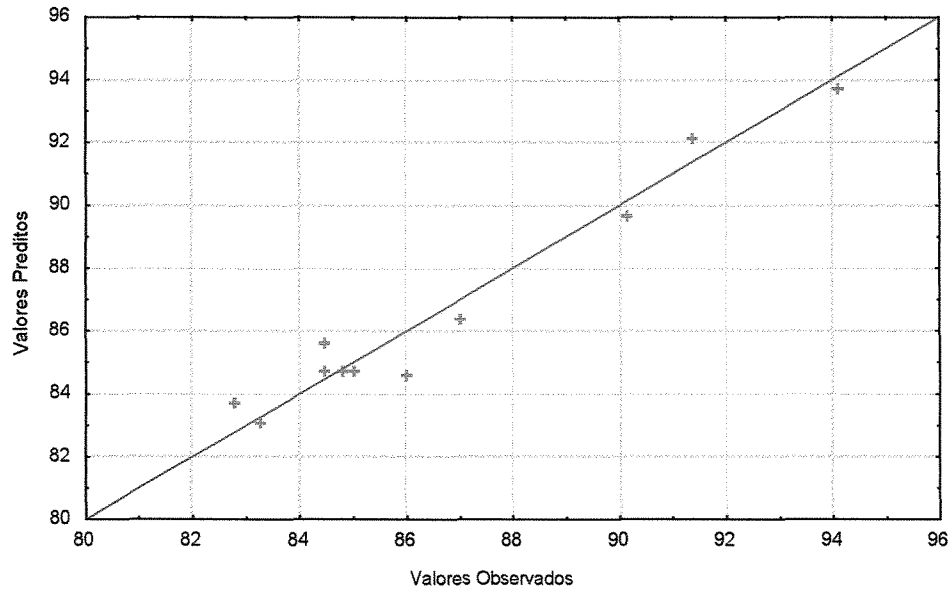
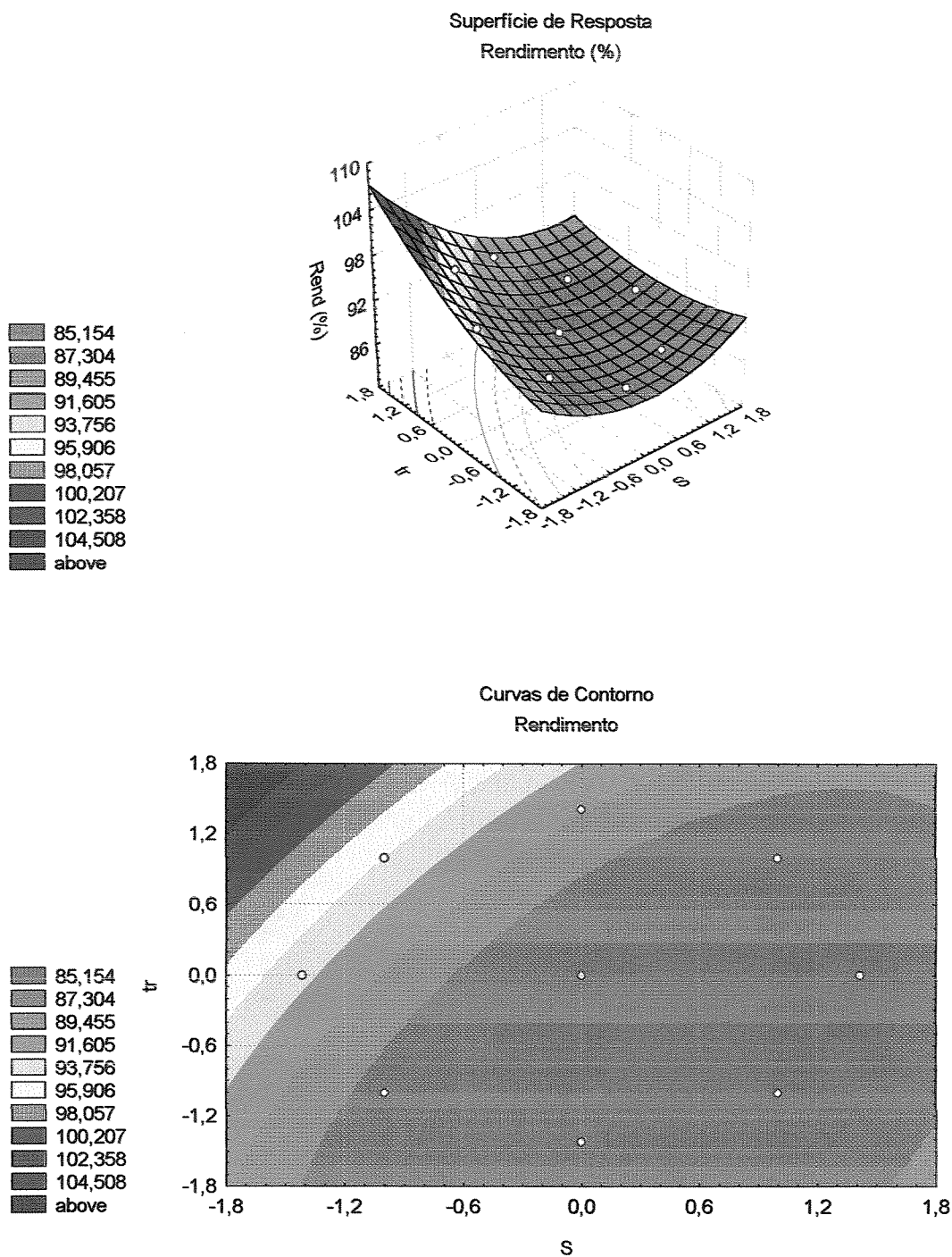


Figura 4.11- Valores preditos versus observados (Rendimento -Arranjo 2)

Assim, sendo o modelo quadrático válido, é possível gerar as superfícies de resposta e as curvas de contorno que serão analisadas para definir as faixas ótimas de operação para otimização do rendimento do processo.

As Figuras 4.12 a e 4.12 b apresentam respectivamente a superfície de resposta e as curvas de contorno para o rendimento em função da concentração de substrato e do tempo de residência.



Figuras 4.12 a e 4.12 b Superfície de Resposta e Curva de Contorno (Rendimento arranjo 2)

Pelas Figuras 4.12 a e 4.12 b percebe-se que quanto menor a concentração de substrato e maior o tempo de residência maior é o rendimento, e que o rendimento tende ao máximo quando se opera o sistema com baixas concentrações de substrato na alimentação e altos tempos de residência.

3.1.2.2 Produtividade Arranjo 2

Após o estudo dos efeitos das variáveis estudadas sobre o rendimento partiu-se para a otimização da produtividade. Para o planejamento fatorial foi utilizada a mesma sequência de ensaios apresentados na Tabela 4.7.

Na Tabela 4.10 são apresentados os efeitos principais de cada variável e os efeitos de interação dos efeitos significativos estatisticamente sobre a produtividade.

Tabela 4.10- Estimativa dos efeitos principais e de interação sobre o produtividade – Arranjo 2 (L é o coeficiente do termo linear e Q é o coeficiente do termo quadrático).

Fator	Efeito	Erro Padrão
Média	22,49*	0,19*
(1) S (L)	3,60*	0,32*
(2) tr (L)	-3,58*	0,32*
S (Q)	-2,17*	0,36*
1L * 2L	3,11*	0,45*

*valores significativos (no nível de 95%); $R^2=0,9340$ Grau de Ajuste =0,8900.

Pode perceber pelos dados apresentados na tabela 4.10 que a concentração de substrato na alimentação apresentou uma influência positiva sobre a produtividade enquanto que o tempo de residência apresentou uma influência negativa. Isto significa que ao variar a concentração de substrato (S) de 150,00 g/L para 200,00 g/L a variável resposta, a produtividade aumenta em média 3,60 g Etanol/ L . h. Para o tempo de residência, quando passa do nível -1 (3 h) para +1 (4 h), provoca uma queda de 3,58 g Etanol/ L . h na produtividade.

A importância dos efeitos principais juntamente com os efeitos de interação podem ser melhor visualizados pelo gráfico de Pareto (Figura 4.13), que mostra uma estimativa dos efeitos de cada variável estatisticamente significativa (valores absolutos).

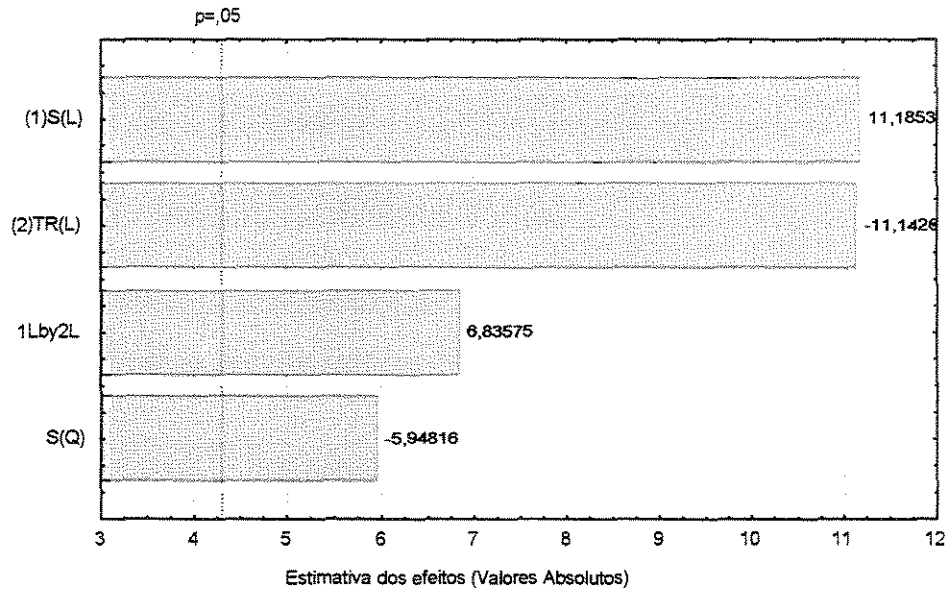


Figura 4.13- Gráfico de Pareto (Produtividade - Arranjo 2)

Pela Figura 4.13 pode-se perceber que os efeitos mais significativos no intervalo de confiança de 95% são o tempo de residência (linear) e a concentração de substrato (linear) na alimentação.

O modelo codificado obtido pela regressão que relaciona a produtividade com a concentração de substrato na alimentação e o tempo de residência é a equação de 2º ordem descrita matematicamente pela equação (4.8)

$$Prod = 22,49 + 1,79 * S - 1,79 * tr - 1,08 * S^2 + 1,55 * S * tr \quad (4.8)$$

A Tabela 4.11 (Tabela ANOVA) faz uma avaliação do desempenho do modelo, onde a percentagem de variação explicada (R^2) é dada pela equação (4.5).

No modelo em estudo obteve-se um valor de R^2 igual a 0,9340, o que significa que 93,40 % das variações nos resultados obtidos podem ser explicados pelo modelo empírico.

Tabela 4.11- ANOVA para o produtividade -Arranjo 2 ($p = N.^{\circ}$ de parâmetros do modelo obtido, $n = N.^{\circ}$ total de ensaios, $m = N.^{\circ}$ de ensaios distintos, g.l = graus de liberdade).

Fonte de Variação	S.Q	g.l	M.Q	Teste F	R^2
Regressão	68,57	p-1=4	17,14	21,16	0,9340
Resíduos	4,84	n-p=6	0,81		
F.Ajuste	4,43	m-p=4	1,10		
E.Puro	0,41	n-m=2	0,205		
Total	73,41	n-1=10			

$F_{4,6} = 4,53$ (tabelado no nível de 95%)

Como o valor tabelado de F para o intervalo de 95% de confiança foi de 4,53 (BRUNS *et. al.*,1996), valor este 4,70 vezes inferior ao valor obtido com o modelo, pode-se afirmar que a quantidade de variação devido ao modelo é significativamente maior que a variação não explicada, atestando assim a validade do modelo obtido.

A precisão adequada do modelo pode ser melhor visualizada pela Figura 4.14, onde são apresentados os valores observados experimentalmente versus os previstos pelo modelo.

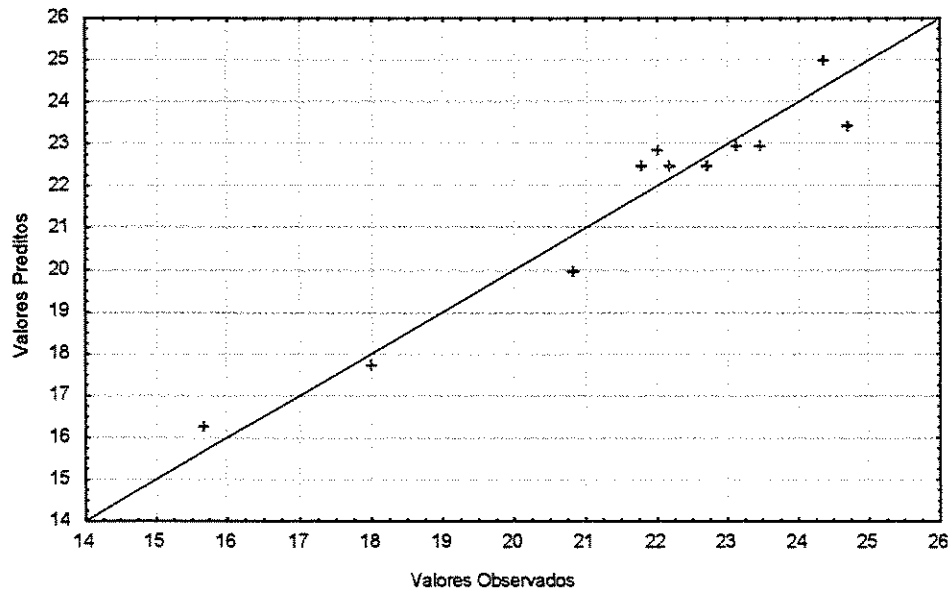
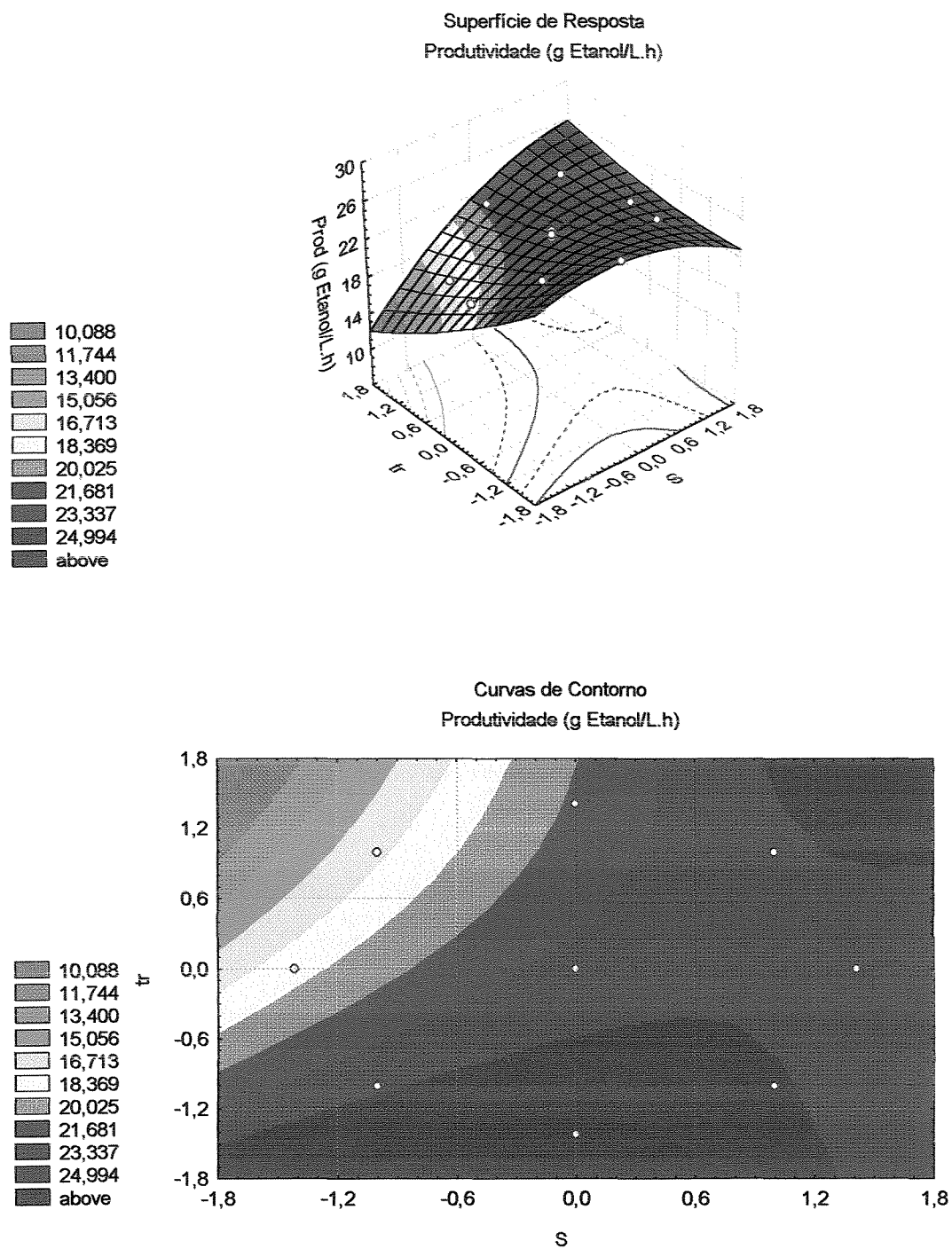


Figura 4.14- Valores Preditos versus observados (Produtividade - Arranjo 2)

Assim, sendo o modelo quadrático válido, é possível gerar as superfícies de resposta e as curvas de contorno que serão analisadas para definir as faixas ótimas de operação para otimização da produtividade do sistema proposto no arranjo 2.

As Figuras 4.15 a e 4.15 b apresentam respectivamente a superfície de resposta e as curvas de contorno para a produtividade em função da concentração de substrato e do tempo de residência.



Figuras 4.15 a e 4.15 b - Superfície de Resposta e Curvas de Contorno (Produtividade- Arranjo 2)

Pelas Figuras 4.15 a e 4.15 b verifica-se que a produtividade apresenta um comportamento antagônico em relação ao rendimento, ou seja, quanto maior a concentração de substrato e menor o tempo de residência maior será a produtividade do sistema.

3.1.2.3 Definições da faixa ótima de operação - Arranjo 2

Para definição do ponto ótimo de operação, deve-se levar em conta a importância do rendimento, ou seja, deve-se buscar obter a maior produtividade possível sem que o valor do rendimento seja afetado.

Como descrito anteriormente, o comportamento dos valores de rendimento e produtividade em função da concentração de substrato e tempo de residência se mostrou antagônicos. Desta forma é necessária a análise das superfícies de ambas as respostas para se definir o ponto ótimo de operação.

Ao analisar as Figuras 4.12 a e 4.12 b, observa-se que o rendimento tende ao máximo para baixas concentrações de substrato e altos tempos de residência.

Valores satisfatórios de rendimento fermentativo (91,61%) podem ser atingidos na faixa que varia de 130-190 g/L de substrato com 2,6 a 4,4 horas de tempo de residência. Para se obter o valor ótimo de operação, a produtividade deve ser a máxima contida nesta faixa.

Após pré-definida esta faixa percebe-se pelas Figuras 4.15 a e 4.15 b que existe uma ampla faixa onde valores de produtividade em torno de 21,68 g Etanol/L.h podem ser atingidos.

Outro fator que deve ser levado em consideração é a concentração de etanol no vinho, pois, quanto maior seu valor, menor será o consumo de vapor e a quantidade de vinhaça gerada na etapa de destilação. Levando-se em conta que a concentração de etanol no vinho é função da concentração de ART para um mesmo rendimento e considerando a necessidade de se obter a maior concentração alcoólica possível, optou-se por trabalhar no ponto que corresponde a 175,00 g/L de ART (9,63 °GL considerando rendimento em torno de 90%) e 4,0 horas de tempo de residência.

3.1.3 Otimização - Arranjo 3

A Tabela 4.12 mostra os resultados experimentais dos testes obtidos no arranjo 3, onde os valores da rendimento e produtividade do sistema foram obtidas pelas equações (4.2) e (4.3) respectivamente.

Tabela 4.12- Ensaios realizados no planejamento fatorial linear, onde: S-Concentração de substrato (g/L) e tr -tempo de residência do substrato no sistema (h) - Arranjo 3.

Caso	S (g/L)	tr (h)	S (g/L)	tr (h)	Produtividade (g Etanol/L. h)	Rendimento (%)
Valores Codificados		Valores Decodificados				
1	-1,00	-1,00	150,00	3,00	26,45	97,84
2	-1,00	+1,00	150,00	4,00	19,88	91,49
3	+1,00	-1,00	200,00	3,00	27,68	86,60
4	+1,00	+1,00	200,00	4,00	25,78	88,58
5	$-\alpha$	0	140,00	3,50	23,01	89,90
6	α	0	210,00	3,50	28,90	85,67
7	0	$-\alpha$	175,00	2,80	27,15	86,27
8	0	α	175,00	4,20	23,62	88,92
9 C	0	0	175,00	3,50	25,83	89,92
10 C	0	0	175,00	3,50	26,16	90,91
11 C	0	0	175,00	3,50	26,37	90,24

Com base nos resultados contidos na Tabela 4.12 foram estudados os efeitos das variáveis independentes sobre o rendimento e a produtividade do sistema proposto no arranjo 3.

3.1.3.1 Rendimento - Arranjo 3

A partir dos dados contidos na Tabela 4.12 e utilizando o “Software Statistica 5.0” obteve-se os valores dos efeitos principais e os de interação de cada variável para o rendimento. A Tabela 4.13 mostra os valores dos efeitos principais juntamente com os efeitos de interação de cada variável estudada.

Tabela 4.13- Estimativa dos efeitos principais e de interação sobre o rendimento – Arranjo 3 (L é o coeficiente do termo linear e Q é o coeficiente do termo quadrático).

Fator	Efeito	Erro Padrão
Média	90,37*	0,29*
(1) S (L)	-2,55*	0,35*
(2) tr (L)	2,31*	0,35*
S (Q)	-2,09*	0,42*
Tr (Q)	-2,28*	0,42*

*valores significativos (no nível de 95%); $R^2=0,9014$; Grau de Ajuste =0,8356.

Pode-se perceber pelos resultados apresentados na Tabela 4.13 que ao variar a concentração de substrato (S) de 150,00 g/L para 200,00 g/L a variável resposta, o rendimento diminui em média 2,55%. Para o tempo de residência, quando passa do nível -1 (3 h) para +1 (4 h), o rendimento sofre um aumento de 2,31%. Para este arranjo o termo de interação não foi significativo estatisticamente no nível de 95% de confiança.

A importância dos efeitos principais juntamente com os efeitos de interação podem ser melhor visualizados pelo gráfico de Pareto (Figura 4.16), que mostra uma estimativa dos efeitos de cada variável estatisticamente significativa no nível de 95% de confiança (valores absolutos).

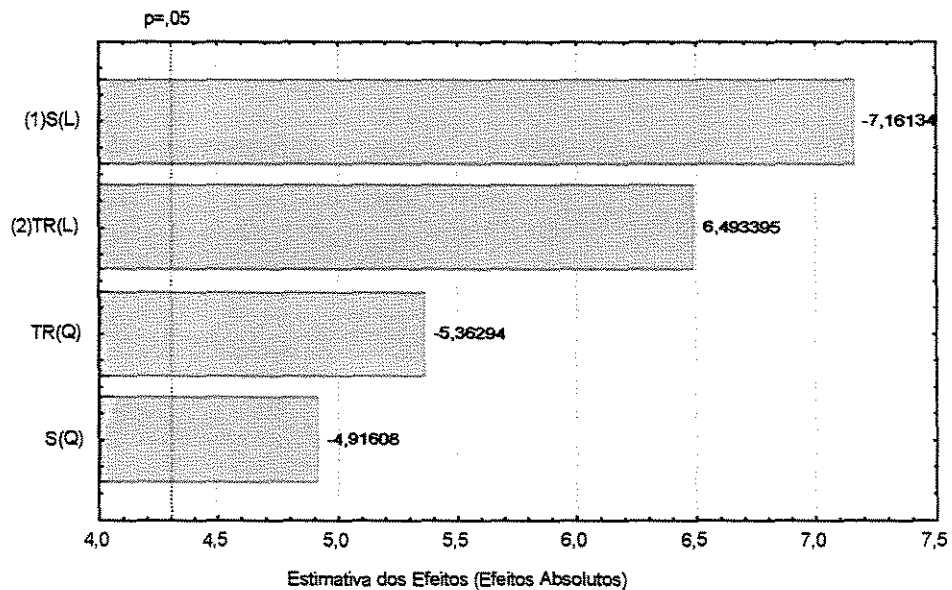


Figura 4.16 - Gráfico de Pareto (Rendimento - Arranjo 3)

Pela Figura 4.16 pode-se perceber que os efeitos mais significativos no intervalo de confiança de 95% são o tempo de residência (linear) e a concentração de substrato (linear) na alimentação. O termo de interação não foi estatisticamente significativo uma vez que a distribuição da alimentação entre os reatores 1 e 2 minimiza os efeitos da taxa de aplicação (g de substrato na alimentação/ h).

O modelo codificado final obtido pela regressão que relaciona o rendimento do sistema com a concentração de substrato na alimentação e o tempo de residência, é a equação de 2º ordem descrita matematicamente pela equação (4.9).

$$Rend = 90,35 - 1,28 * S + 1,16 * tr - 1,04 * S^2 - 1,14 * tr^2 \quad (4.9)$$

A Tabela 4.14 (Tabela ANOVA) faz uma avaliação do desempenho do modelo obtido, onde a percentagem de variação explicada (R^2) é dada pela equação (4.5).

No modelo em estudo obteve-se um valor de R^2 igual a 0,9014, o que significa que 90,14 % das variações nos resultados obtidos podem ser explicados pelo modelo empírico.

Tabela 4.14 ANOVA para o rendimento -Arranjo 3 (p = N.º de parâmetros do modelo obtido, n = N.º total de ensaios, m = N.º de ensaios distintos, g.l = graus de liberdade).

Fonte de Variação	S.Q	g.l	M.Q	Teste F	R^2
Regressão	34,31	p-1=4	8,57	13,82	0,9014
Resíduos	3,75	n-p=6	0,62		
F.Ajuste	3,24	m-p=4	0,81		
E.Puro	0,51	n-m=2	0,255		
Total	38,06	n-1=10			

$F_{4,6} = 4,53$ (tabelado no nível de 95%)

Como o valor tabelado de F para o intervalo de 95% de confiança foi de 4,53 (BRUNS *et. al.*,1996), valor este 3,10 vezes inferior ao valor obtido com o modelo, pode-se afirmar que a quantidade de variação devido ao modelo é significativamente maior que a variação não explicada, atestando assim a validade do modelo obtido.

A precisão adequada do modelo pode ser melhor visualizada pela Figura 4.17, onde são apresentados os valores observados experimentalmente versus os previstos pelo modelo.

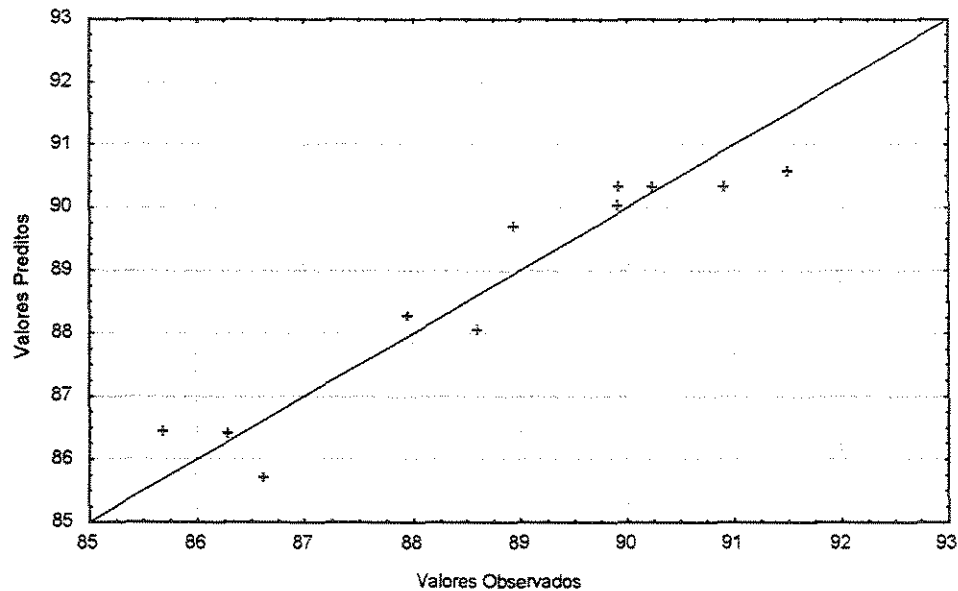
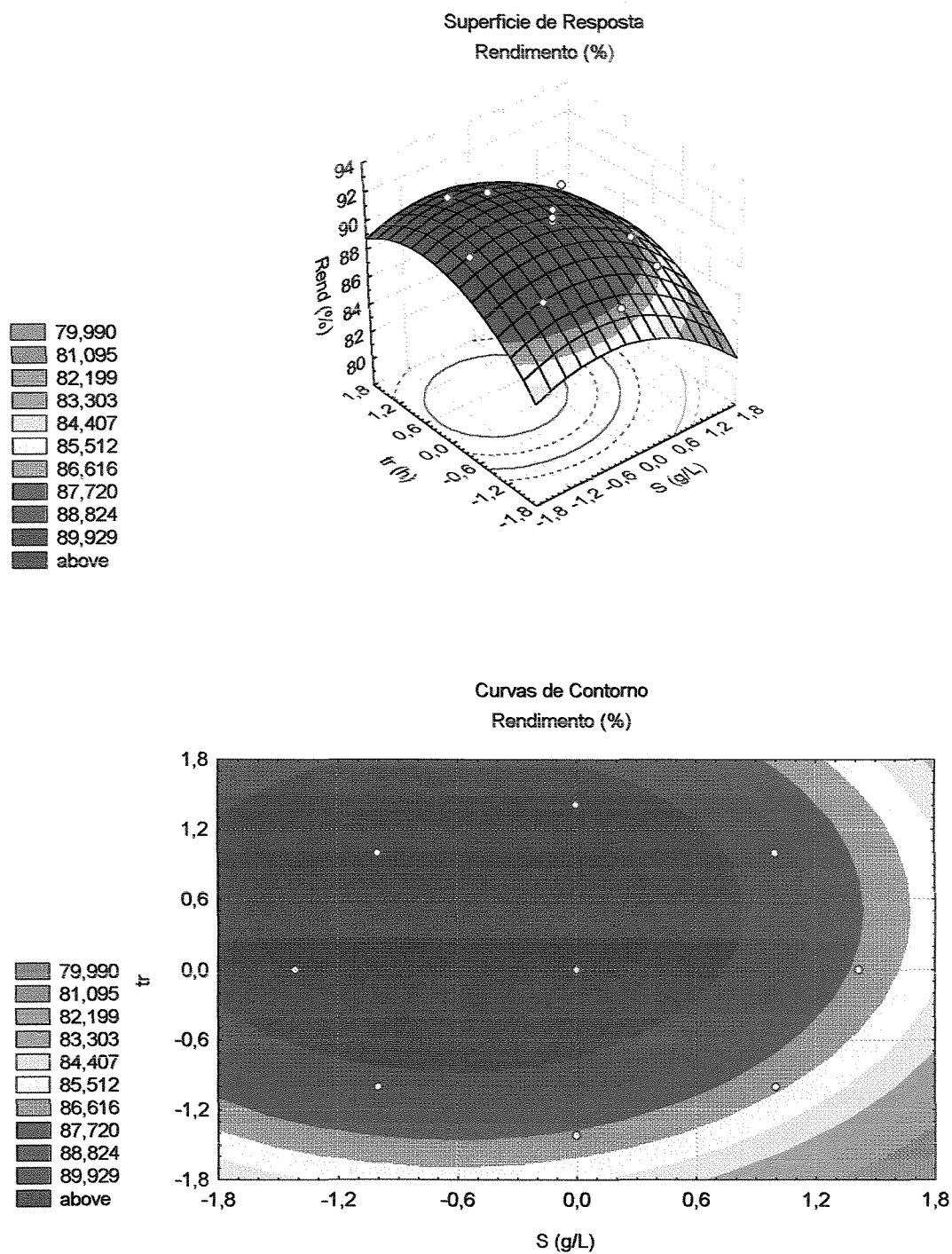


Figura 4.17 - Valores Preditos versus observados (Rendimento Arranjo 3)

Assim, sendo o modelo quadrático válido, é possível gerar as superfícies de resposta e as curvas de contorno que serão analisadas para definir as faixas ótimas de operação para otimização do rendimento do sistema proposto no arranjo 3.

As Figuras 4.18 a e 4.18 b apresentam respectivamente a superfície de resposta e as curvas de contorno para o rendimento em função da concentração de substrato e do tempo de residência.



Figuras 4.18 a e 4.18 b - Superfície de Resposta e Curvas de Contorno (Rendimento arranjo 3)

Através das Figuras 4.18 a e 4.18 b percebe-se que quanto menor a concentração de substrato e maior o tempo de residência maior é o rendimento.

3.1.3.2 Produtividade arranjo 3

Após o estudo dos efeitos das variáveis estudadas sobre o rendimento partiu-se para a otimização da produtividade. Para o planejamento fatorial foi utilizada a mesma sequência de ensaios apresentados na Tabela 4.12.

Na Tabela 4.15 são apresentados os efeitos principais de cada variável e os efeitos de interação dos efeitos significativos estatisticamente sobre a produtividade.

Tabela 4.15- Estimativa dos efeitos principais e de interação sobre o produtividade – Arranjo 3 (L é o coeficiente do termo linear e Q é o coeficiente do termo quadrático).

Fator	Efeito	Erro Padrão
Média	25,53*	0,08*
(1) S (L)	3,86*	0,19*
(2) tr (L)	-3,36*	0,19*
1L * 2L	2,33*	0,27*

*valores significativos (no nível de 95%); $R^2=0,9257$ Grau de Ajuste =0,8939.

Pode perceber pelos dados apresentados na Tabela 4.15 que a concentração de substrato na alimentação apresentou uma influência positiva sobre a produtividade enquanto que o tempo de residência apresentou uma influência negativa. Isto significa que ao variar a concentração de substrato (S) de 150,00 g/L para 200,00 g/L a variável resposta, a produtividade aumenta em média 3,86 g Etanol/ L . h. A mesma avaliação pode ser feita para o tempo de residência, quando passa do nível -1 (3 h) para +1 (4 h), provoca uma queda de 3,36 g Etanol/ L . h na produtividade.

A importância dos efeitos principais juntamente com os efeitos de interação podem ser melhor visualizados pelo gráfico de Pareto (Figura 4.19), que mostra uma estimativa dos efeitos de cada variável estatisticamente significativa (valores absolutos).

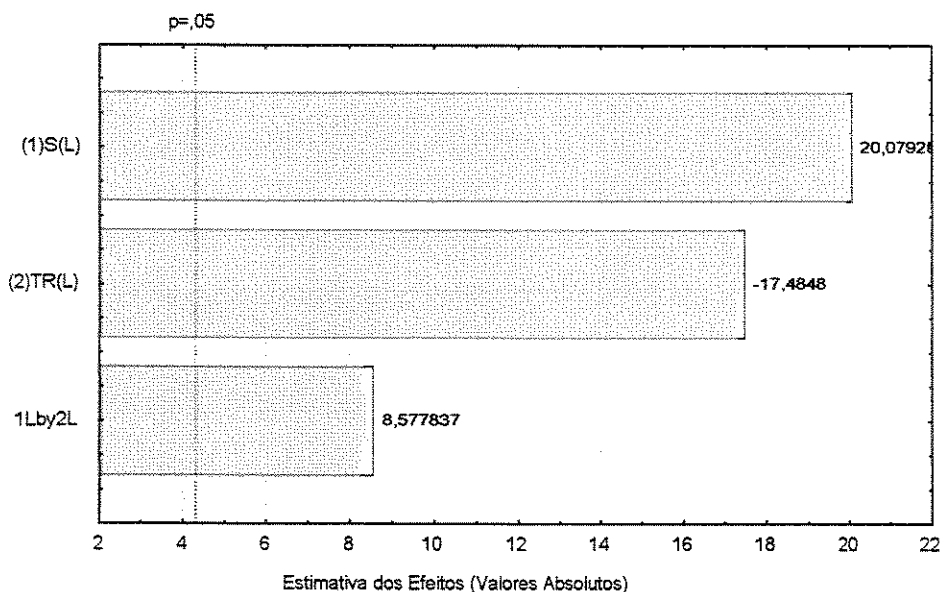


Figura 4.19- Gráfico de Pareto (Produtividade - Arranjo 3)

Pela Figura 4.19 pode-se perceber que os efeitos mais significativos no intervalo de confiança de 95% são o tempo de residência (linear) e a concentração de substrato (linear) na alimentação.

O modelo codificado final obtido pela regressão que relaciona a produtividade com a concentração de substrato na alimentação e o tempo de residência é a equação de 1º ordem descrita matematicamente pela equação (4.10).

$$Prod = 25,53 + 1,93 * S - 1,68 * tr + 1,17 * S * tr \quad (4.10)$$

A Tabela 4.16 (Tabela ANOVA) faz uma avaliação do desempenho do modelo, onde a percentagem de variação explicada (R^2) é dada pela equação (4.5).

No modelo em estudo obteve-se um valor de R^2 igual a 0,9257, o que significa que 92,57 % das variações nos resultados obtidos podem ser explicados pelo modelo empírico.

Tabela 4.16- ANOVA para o produtividade -Arranjo 3 ($p = N.^{\circ}$ de parâmetros do modelo obtido, $n = N.^{\circ}$ total de ensaios, $m = N.^{\circ}$ de ensaios distintos, $g.l =$ graus de liberdade).

Fonte de Variação	S.Q	g.l	M.Q	Teste F	R^2
Regressão	57,98	$p-1=3$	19,32	29,27	0,9257
Resíduos	4,65	$n-p=7$	0,66		
F.Ajuste	4,50	$m-p=5$	0,90		
E.Puro	0,15	$n-m=2$	0,075		
Total	62,63	$n-1=10$			

$F_{3,7} = 4,35$ (tabelado no nível de 95%)

Como o valor tabelado de F para o intervalo de 95% de confiança foi de 4,35 (BRUNS *et. al.* 1996), valor este 6,73 vezes inferior ao valor obtido com o modelo, pode-se afirmar que a quantidade de variação devido ao modelo é significativamente maior que a variação não explicada, atestando assim a validade do modelo obtido.

A precisão adequada do modelo pode ser melhor visualizada pela Figura 4.20, onde são apresentados os valores observados experimentalmente versus os previstos pelo modelo.

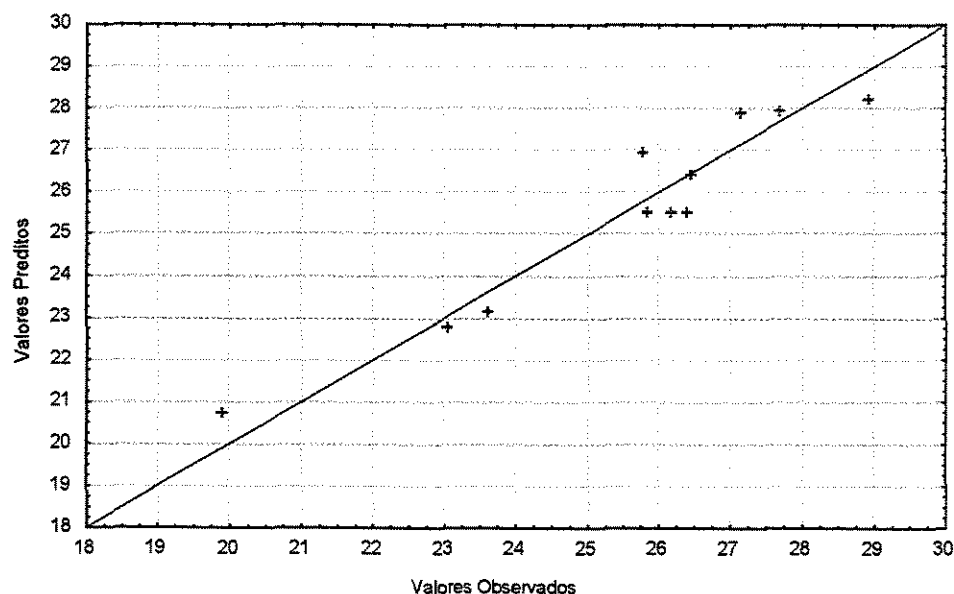
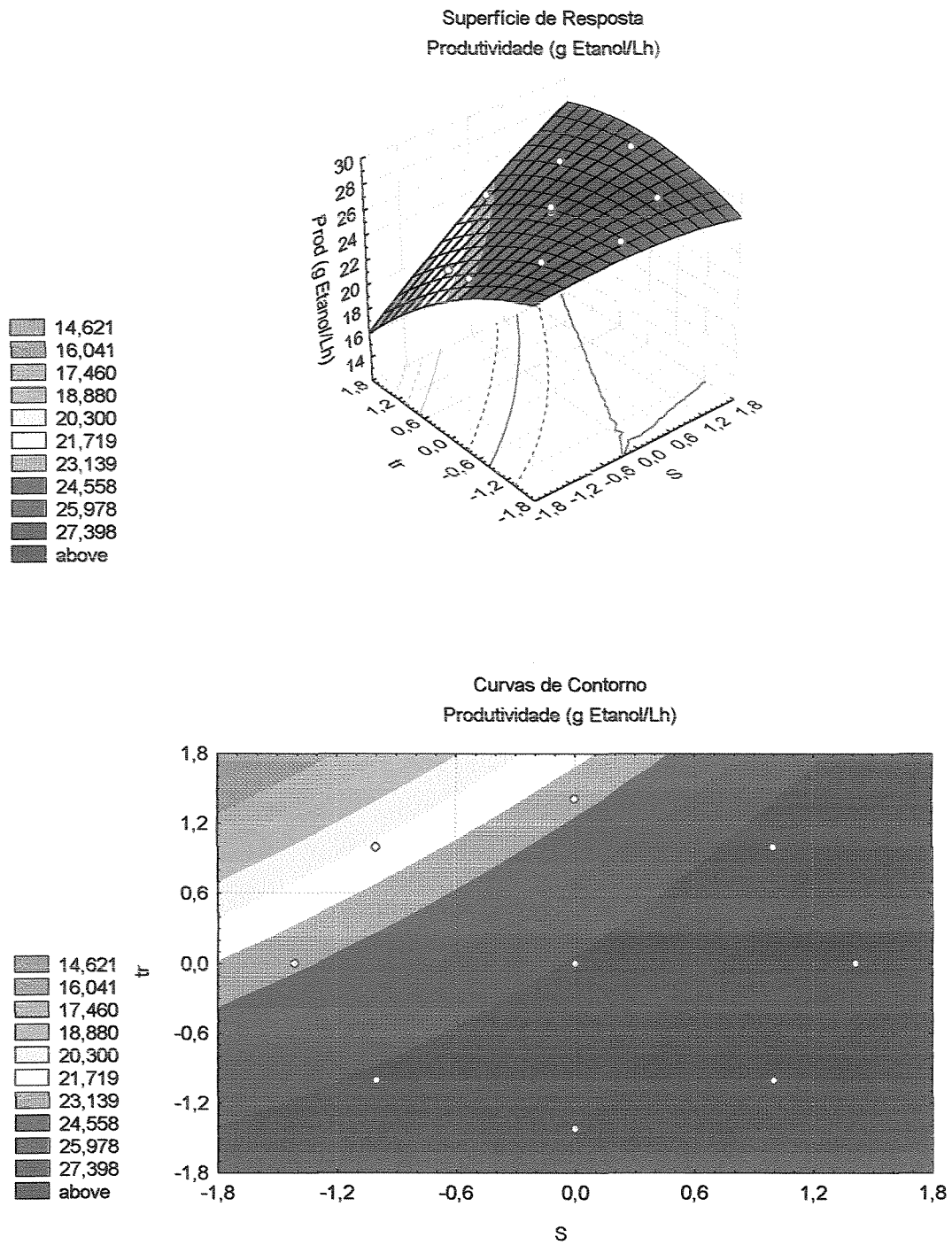


Figura 4.20- Valores Preditos versus observados (Produtividade - Arranjo 3)

Assim, sendo o modelo de primeira ordem válido, é possível gerar as superfícies de resposta e as curvas de contorno que serão analisadas para definir as faixas ótimas de operação para otimização da produtividade do sistema proposto no arranjo 3.

As Figuras 4.21 a e 4.21 b apresentam respectivamente a superfície de resposta e as curvas de contorno para a produtividade em função da concentração de substrato e do tempo de residência.



Figuras 4.21 a e 4.21 b - Superfície de resposta e curvas de contorno (Produtividade arranjo 3)

Através das Figuras 4.21 a e 4.21 b verifica-se que quanto maior a concentração de substrato e menor o tempo de residência maior é a produtividade do sistema proposto no arranjo 3.

3.1.3.3 Definições da faixa ótima de operação - Arranjo 3

Pelas Figuras 4.18 a e 4.18 b pode-se perceber que valores satisfatórios de rendimento fermentativo (acima de 90%) podem ser atingidos na faixa que varia de 135 - 185 g/L de substrato com 3,3 a 4,25 horas de tempo de residência. Para se obter o valor ótimo de operação, a produtividade deve ser a máxima contida nesta faixa.

Na faixa pré-definida, é possível obter através das Figuras 4.21 a e 4.21 b uma produtividade máxima de 27,39 g Etanol/ L. h para valores de 165 g/L de substrato e 3,3 horas de tempo de residência até 185 g/L de substrato e 3,8 horas de tempo de residência.

Levando-se em conta que a concentração de etanol no vinho é função da concentração de ART para um mesmo rendimento e considerando a necessidade de se obter a maior concentração alcoólica possível, optou-se por trabalhar no ponto que corresponde a 185 g/L de ART (10,17 °GL, considerando rendimento em torno de 90%) e 3,8 horas de tempo de residência.

3.1.4 Escolha do Melhor Arranjo

Os resultados obtidos nos três arranjos estudados apresentam ganhos significativos quando comparados com trabalhos anteriores que utilizaram sistemas de produção de etanol utilizando células flocculantes em reatores tipo torre. VIEGAS (2002) trabalhando com dois reatores tipo torre ligados em série utilizando leveduras flocculantes obteve produtividade máxima de 15,40 g Etanol/L.h mantendo o rendimento na faixa de 93%. PAIVA *et al.* (1996) utilizando sistemas de reatores de leito fluidizado para produção de etanol, obteve produtividades de 14,40 g Etanol/L. h e rendimentos de 88,3%.

Uma vez que os rendimentos máximos obtidos em cada um dos arranjos estudados atingiram os níveis aceitáveis industrialmente (em torno de 90%), e o leito de células manteve-se estável, não apresentando mudanças visuais significativas nas características dos

flocos nos três arranjos apresentados, optou-se por selecionar o arranjo que apresentou maior produtividade.

Dentre os três arranjos estudados o arranjo 3 (Figura 4.22) apresentou produtividade máxima de 27,39 g Etanol/L.h superior aos 26,29 g Etanol/L.h e 21,68 g Etanol/L.h dos arranjos 1 e 2 respectivamente, sendo, portanto o arranjo selecionado como ótimo onde posteriormente no Capítulo 05 foi testado seu desempenho com matérias primas de uso industrial, onde estes resultados foram comparados com os obtidos utilizando meio sintéticos (meio de referência).

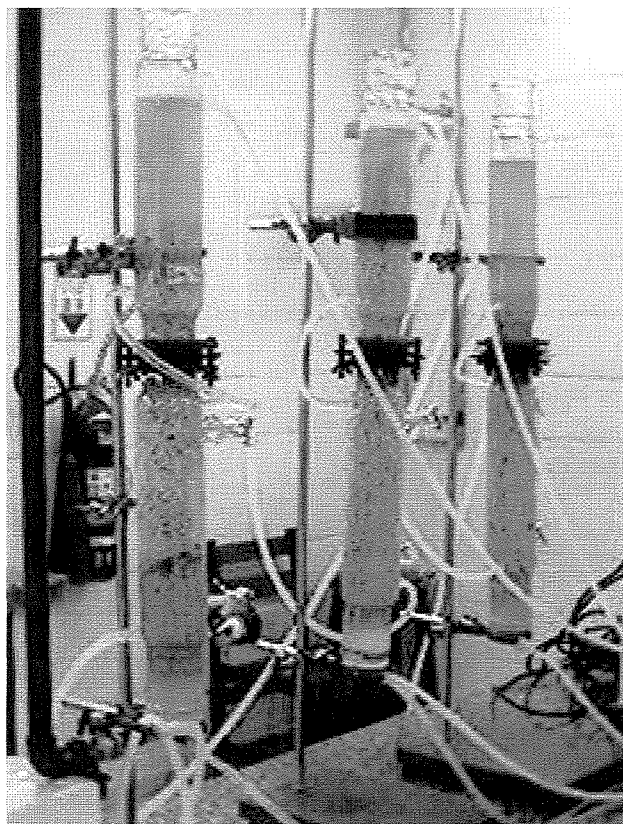


Figura 4.22- Foto do Arranjo 3 (Arranjo Ótimo- Após 75 dias de ensaios)

Pela Figura 4.22 pode-se perceber a alta concentração de células no leito formado mesmo após o sistema ter sido submetido a mais de 75 dias consecutivos de ensaios, comprovando assim sua eficiência e alta estabilidade do leito, principal requisito para que o mesmo possa ser empregado industrialmente.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. Statistics for experimenters. New York, Editora Wiley, 1978. 652 p.
- BRUNS, R.E.; SCARMINIO, I.S, NETO B.B. Planejamento e Otimização de Experimentos Campinas: Editora da Unicamp, 1995, 299 p.
- BU'LOCK, J.D. Practical advantages of very flocculent yeast for alcohol production in single and multiple continuous systems. Int. Spec. Symp. Yeast. England, v.8, A .186, 1983.
- HARSHBARGER, D.; BAUTZ, M.; DAVISON, B.H; SCOTT, T.C; SCOTT, C.D. Economic assessment of ethanol production comparing traditional and fluidized bed bioreactors. Applied Biochemistry and Biotechnology. v.51, n.52, p.593-604, 1995.
- KHURI, A. I.; CORNELL, J.A . Responses Surfaces - Designs and Analyses. New York: ASQC Quality Press, 1987. 405 p.
- KURIYAMA, H.; SEIKO, Y.; MURAKAMI, T.; KOBAYASHI, H.; SONODA, Y. Continuous ethanol fermentation with cell recycling using flocculating yeast. Journal Ferment. Technol. V.63, n.2, pp.159-165, 1985.
- KURIYAMA, H.; ISHIBASHI, H.; MIYAGAWA, H.; KOBAYASHI, H.; MIKAMI, E. Biotechnology Letters. V.15, n.4, 1993
- PAIVA, T.C.B., SATO, S., VISCONTI, A.E.S., CASTRO, L.A.B. Continuous alcoholic fermentation process in a tower with recycling of flocculating yeast. Applied Biochemistry and Biotechnology. v.57, n.58, p.535-541, 1996.
- PRINCE, I. G.; BARFORD, J. P. Continuous Tower fermentation for power ethanol production. Biotechnology Letters. v.4, n.4, p.263-268, 1982.
- ROTTENBACKER, L., SCHOSSLER, M., BAUER, W. Modelling of solid-state fluidized bed fermenter for ethanol production with *S. cerevisiae*. Bioprocess Eng. v. 2, p.25-31, 1987.

VIEGAS, M.C. Desenvolvimento de um Reator de Bancada de Leito Fluidizado para Produção de Etanol Utilizando Linhagens de Leveduras Floculantes. Campinas: FEQ, UNICAMP, 1999. Tese (Mestrado)- Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999.

VIEGAS, M.C.; ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; Use of tower reactors for continuous ethanol production, Brazilian Journal of Chemical Engineering. v.19, n.02, pp.167-173,2002.

CAPÍTULO 5

TESTE DO ARRANJO ÓTIMO COM MATÉRIAS-PRIMAS DE USO INDUSTRIAL

ÍNDICE

OBJETIVO	118
1 Introdução	118
2 MATERIAIS E MÉTODOS	118
2.1 Méis Provenientes de Fábricas de Açúcar com Diferentes Níveis de Esgotamentos	118
2.1.1 Caracterização dos Méis	119
2.1.2 Condução dos Ensaios Utilizando Méis com Diferentes Níveis de Esgotamento	119
2.2 Materiais Efluentes de Industrias de Alimentos	119
2.2.1 Tratamento da Matéria-prima (Licor de primeira pressão)	119
2.2.2 Caracterização do Licor de Primeira Pressão	120
2.2.3 Condução dos Ensaios Utilizando Licor de Primeira Pressão	120
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	121
3.1 Méis provenientes de Fábricas de açúcar com diferentes níveis de esgotamentos	121
3.2 Materiais efluentes de industrias de alimentos (Licor de Primeira Pressão)	124

OBJETIVO

Neste capítulo foram realizados testes com diferentes matérias-primas de uso industrial, onde se utilizou o arranjo escolhido como ótimo (arranjo 3) nas condições ótimas de operação, objetivando comparar os resultados obtidos com aqueles utilizando meio sintético (meio de referência).

1 INTRODUÇÃO

Nesta fase foram realizados testes com diferentes matérias-primas de uso industrial, onde se utilizou o arranjo escolhido como ótimo (Arranjo 3) nas condições ótimas de operação. O objetivo destes testes foi estudar a performance do sistema proposto com matérias-primas de uso industrial, objetivando um futuro uso do sistema em estudo em escala piloto.

As matérias-primas utilizadas nesta etapa foram: (a) Méis provenientes de fábricas de açúcar com diferentes níveis de esgotamento e (b) Licor de primeira pressão (material açucarado proveniente da última prensagem do bagaço de laranja de fábrica de suco concentrado – CITROSUCO/Matão-SP).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Méis Provenientes de Fábricas de Açúcar com Diferentes Níveis de Esgotamentos

Nesta etapa foram testados três méis provenientes de fábricas de açúcar com diferentes níveis de esgotamentos. Foram testados os méis provenientes das Usinas: Estér (Cosmópolis/SP), Alvorada (Araguari/MG) e Santa Cândida (Bocaina/SP), onde estes apresentaram diferentes valores de pureza em ART (%).

2.1.1 Caracterização dos Méis

Para caracterizar cada mel utilizado, foram calculados: (a) Brix (conforme descrito no capítulo 2 - item 2.5.2) diluindo (p/p) cada mel 1/6; (b) Pureza (equação 5.1), (c) ART (açúcares redutores totais - conforme no capítulo 2 - item 2.5.1), (d) Concentração de ART (%) (equação 5.2) e (e) Densidade das amostras (equação 5.3).

$$Pureza(\%) = \frac{ART(\%)}{Brix} * 100 \quad (5.1)$$

$$ART(\%) = \left(\frac{ART(g/L)}{(dens * 10)} \right) \quad (5.2)$$

$$Dens = 0,00434 * Brix(\%p/p) + 0,9964 \quad (5.3)$$

2.1.2 Condução dos Ensaios Utilizando Méis com Diferentes Níveis de Esgotamento

Depois de caracterizado cada mel, partiu-se para os testes em fermentação de bancada, onde o sistema foi operado nas condições ótimas do arranjo ótimo (Arranjo 3).

2.2 Materiais Efluentes de Industrias de Alimentos

Nesta etapa foi testado no sistema de fermentadores otimizado material açucarado proveniente da última prensagem do bagaço de laranja de fábricas de suco concentrado (licor de primeira pressão). O material a ser fermentado utilizado nesta etapa foi coletado do processo industrial de fabricação de suco concentrado de laranja na unidade de produção da CITROSUCO localizada em Matão/SP.

2.2.1 Tratamento da Matéria-prima (Licor de primeira pressão)

O material coletado (licor de primeira pressão) por se tratar de um sub-produto do processo industrial apresenta em sua constituição 20% de polpa de laranja, que deve ser eliminado antes que o mesmo seja utilizado na alimentação do sistema de fermentação otimizado. Esta eliminação se faz necessário uma vez que a alta concentração de polpa em

suspensão presente inicialmente no material a ser fermentado pode ocasionar a desestabilização do leito de células formado, que é o fator essencial para se operar o processo proposto com altas produtividades e rendimentos satisfatórios.

O tratamento aplicado ao licor de primeira pressão foi uma decantação a frio, onde o material a ser tratado foi resfriado a temperaturas em torno de 4°C permanecendo nesta condição por 24 horas. Após percorrido este tempo o material sobrenadante foi testado no sistema de fermentação otimizado e o material precipitado composto em sua maioria por polpa foi descartado.

2.2.2 Caracterização do Licor de Primeira Pressão

Após submeter o material coletado industrialmente ao tratamento conforme descrito no item 2.2.1, partiu-se para a caracterização do material sobrenadante para posterior utilização do mesmo na alimentação do sistema de fermentação otimizado.

Para caracterizar o licor de primeira, foram calculados: (a) Brix (conforme descrito no capítulo 2 - item 2.5.2) diluindo (p/p) cada mel 1/6; (b) Pureza (equação 5.1), (c) ART (açúcares redutores totais - conforme no capítulo 2 - item 2.5.1), (d) Concentração de ART (%) (equação 5.2) e (e) Densidade das amostras (equação 5.3).

2.2.3 Condução dos Ensaios Utilizando Licor de Primeira Pressão

A duração do teste foi de 5 dias corridos, onde o sistema apresentou-se estável por todo o período de ensaio a que foi submetido. A quantidade de material coletado foi a variável limitante para a duração dos testes, uma vez que o volume coletado na indústria foi de 120 litros, resultando após etapa de tratamento e retirada da polpa em 96 litros de licor de primeira pressão. Como a alimentação foi feita diretamente a partir dos frascos contendo o material a ser fermentado, considerando que a vazão de alimentação foi de 0,84 L/hora (20,16 L/dia) o volume de licor de primeira foi suficiente apenas para 5 dias de testes.

Depois de caracterizado o material a ser fermentado, partiu-se para os testes de fermentação em bancada, onde o sistema foi operado nas seguintes condições: Concentração ART na alimentação= 91,33 g/L e 3,8 horas de tempo de residência. Não foi possível operar o sistema nas condições ótimas (185,00 g/L de ART e 3,8 de tempo de residência) uma vez que o licor de primeira apresentou concentração de ART máxima de 91,33 g/L.

A fermentação foi monitorada por amostragens periódicas do vinho fermentado em cada um dos três reatores, do meio concentrado e do efluente onde se determinou em cada uma delas a concentração de ART, concentração de etanol e a altura e estabilidade do leito de células formado.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Méis provenientes de Fábricas de açúcar com diferentes níveis de esgotamentos

A Tabela 5.1 apresenta os resultados obtidos na caracterização de cada mel testado.

Tabela 5.1 – Características dos méis utilizados.

Mel	Densidade (g/ml)	Brix (%)	ART (g/l)	ART (%)	Pureza (%)
Usina Alvorada	1,3269	76,17	752,32	56,69	74,43
Usina Ester	1,3297	76,80	657,73	49,46	64,40
Usina S ^{ta} Cândida	1,3251	75,76	602,18	45,44	59,97

Como pode ser observado pelos resultados apresentados na Tabela 5.1 a pureza dos méis utilizados variam de 59,97% até 74,43%. Dentre os méis testados o mel proveniente da Usina Santa Cândida apresentou a menor pureza (mais esgotado), pois, apesar de ser um mel de segunda massa como os outros dois, este é proveniente da produção de açúcar VHP (Very High Polarization) que por se tratar de um tipo de açúcar menos puro permite uma maior retenção na fábrica, ou seja, mais sacarose é produzida e conseqüentemente menos é enviada para o mel diminuindo a pureza do mesmo.

A Tabela 5.2 mostra os resultados obtidos experimentalmente para cada mel testado nas condições ótimas de operação do Arranjo 3 (Capítulo 04 -185 g/L de ART e 3,8 horas de tempo de residência).

Tabela 5.2- Resultados experimentais obtidos para cada mel testado nas condições ótimas de operação.

Mel	ART (g/L) na Alimentação (Saída do diluidor)	ART (g/L) Na saída do reator 3	Etanol (°GL) Na saída do Reator 3	Altura do leito formado em cada reator (cm)
Usina Alvorada	185,26	6,37	10,87	46,50
Usina Ester	183,95	10,68	10,58	45,00
Usina S ^{ta} Cândida	184,02	14,02	9,70	40,00

A partir dos dados contidos na Tabela 5.2 calculou-se: (a) o rendimento (Cap.04 equação 4.2), (b) a produtividade (Cap.04 equação 4.3) e a conversão em ART(%) obtidos para cada mel estudado.

A Tabela 5.3 mostra os resultados obtidos para cada mel, onde estes valores são comparados com um valor de referência (meio sintético), quando fermentado nas mesmas condições de operação do sistema.

Tabela 5.3 – Valores dos Rendimentos e Produtividades obtidos para cada mel utilizado

Mel	Produtividade (g Etanol/L.h)	Rendimento (%)	Conversão ART (%)
Usina Alvorada	28,60	90,61	96,56
Usina Ester	27,84	88,82	94,19
Usina S ^{ta} Cândida	25,52	81,40	92,38
Sintético	27,39	91,00	97,37

Pelos dados da Tabela 5.3 observa-se que os resultados obtidos utilizando-se méis industriais foram muito satisfatórios quando comparados com os resultados de referência (meio sintético). Pode-se perceber que os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou o mel da Usina Alvorada (menos esgotado), que possui maior pureza dentre os méis testados.

Quando utilizado o mel da Usina Santa Cândida (mais esgotado) observou-se que os menores valores de rendimento e produtividade foram obtidos, havendo perdas significativas no que diz respeito ao rendimento do sistema e conversão em ART (%).

Os resultados apresentados na Tabela 5.3 podem ser melhor visualizado pela Figura 5.1, que compara os valores de produtividade, conversão em ART (%) e rendimento (%) obtidos para cada mel, com o meio de referência (meio sintético).

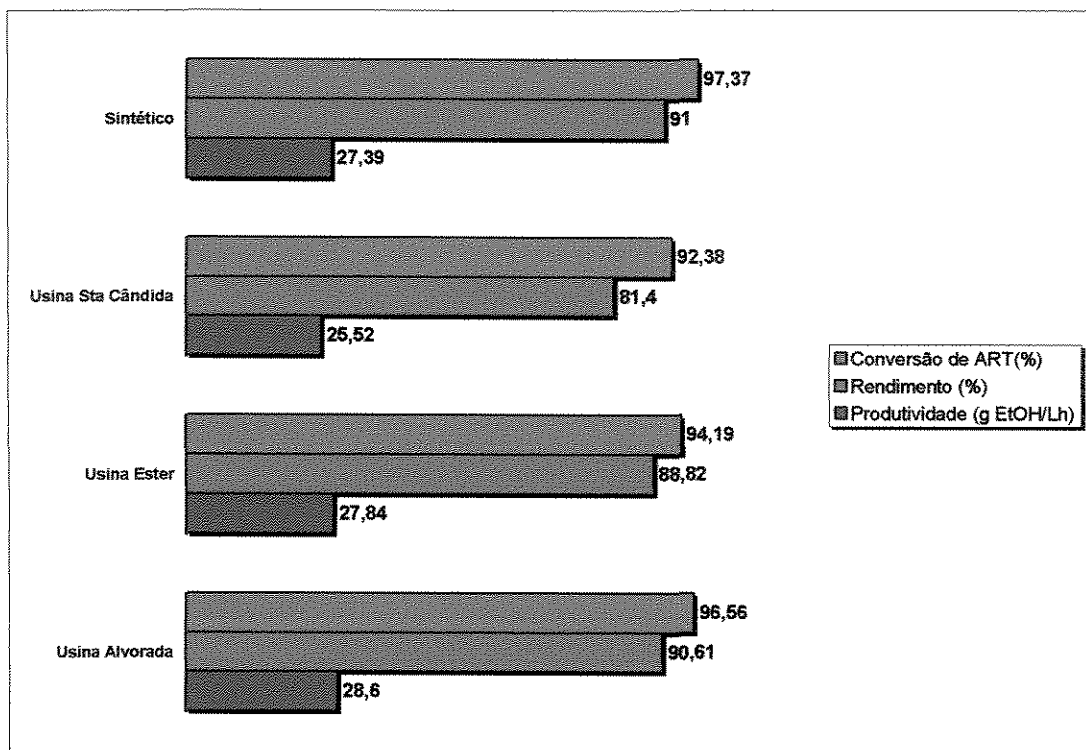


Figura 5.1- Comparação dos resultados obtidos para cada mel testado com o meio de referência (sintético)

Os resultados obtidos representam ganhos significativos principalmente no que diz respeito às altas produtividades, uma vez que se opera o sistema com altas concentrações celulares (45% v/v). A utilização de concentrações celulares deste nível em sistemas que fazem uso de separadoras centrífugas não é uma prática economicamente viável uma vez que se faz necessário um elevado número dessas máquinas para realização da concentração de células, aumentando o custo de produção do álcool.

Outro fator que deve ser levado em consideração é a concentração de etanol no vinho, pois, quanto maior seu valor, menor será o consumo de vapor e a quantidade de vinhaça gerada na etapa de destilação. Pela Tabela 5.2 pode-se perceber que os valores de

concentração de etanol no vinho fermentado (saída do reator 3) foram em torno de 10°GL, sendo obtidos valores de até 10,87°GL quando utilizado o mel da usina Alvorada.

3.2 Materiais efluentes de indústrias de alimentos (Licor de Primeira Pressão)

A Tabela 5.4 apresenta os resultados obtidos na caracterização do licor de primeira pressão conforme descrito no item 2.2.2.

Tabela 5.4 – Características do licor de primeira pressão utilizado na alimentação do sistema otimizado.

Material	Densidade (g/ml)	Brix (%)	ART (g/l)	ART (%)	Pureza (%)
Licor de primeira pressão	1,0766	18,50	91,33	8,48	45,85

Como pode ser observado pelos resultados apresentados na Tabela 5.4 a concentração de açúcares presente no material a ser fermentado é baixa (91,33 g/L e 8,48% em ART), motivo este que levou o mesmo a ser alimentado diretamente no sistema sem se utilizar o sistema de diluição em linha.

A Tabela 5.5 mostra os resultados obtidos experimentalmente para o licor de primeira pressão testado no sistema otimizado onde os ensaios foram realizados conforme descrito no item 2.2.3.

Tabela 5.5- Resultados experimentais obtidos para o licor de primeira pressão utilizado no sistema de fermentação otimizado (Arranjo 3).

Dias de Ensaio	Brix (%) (Alimentação)	ART (g/L) na Alimentação	ART (g/L) Na saída do reator 3	Etanol (°GL) Na saída do Reator 3	Altura do leito formado em cada reator (cm)
1	18,80	91,99	10,09	5,47	32
2	18,80	91,45	11,14	5,21	30
3	18,50	91,33	10,36	5,21	30
4	18,50	91,33	10,91	4,99	30
5	18,50	91,33	10,89	5,10	33

Pode-se perceber pelos dados apresentados na Tabela 5.5 que o sistema se apresentou estável durante os 5 dias de ensaio. Outro ponto que é relevante é a altura de leito variando em torno de 30 cm, estes valores estão bem abaixo dos obtidos quando se opera o sistema com mel e meio sintético, uma vez que a baixa concentração de substrato na alimentação, e conseqüentemente baixa produção de CO₂ faz com que o leito de células formado fique mais compactado quando comparado aos ensaios utilizando outros substratos mais concentrados.

A partir dos dados contidos na Tabela 5.5 calculou-se: (a) o rendimento (Cap.04 equação 4.2), (b) a produtividade (Cap.04 equação 4.3) e a conversão em ART(%) obtidos para cada mel estudado.

A Tabela 5.6 mostra os valores dos resultados obtidos, onde estes valores são comparados com o valor de referência (meio sintético), quando fermentado nas mesmas condições de operação do sistema.

Tabela 5.6– Valores dos Rendimentos e Produtividades obtidos utilizando licor de primeira pressão na alimentação do sistema de fermentação.

Dias de Ensaio	Produtividade (g Etanol/L.h)	Rendimento (%)	Conversão ART (%)
1	14,39	91,83	89,03
2	13,71	87,98	87,81
3	13,71	88,10	88,65
4	13,12	84,38	88,05
5	13,41	86,24	88,07
Sintético	15,78	92,66	89,90

Pode-se perceber pelos dados apresentados na Tabela 5.6 que o sistema se mostrou estável durante os 5 dias de ensaio em que foi submetido. Os valores obtidos quando comparados com o valor de referência (meio sintético) foram satisfatórios no que diz respeito a conversão de ART (%) e produtividade (g Etanol/L.h).

Apesar dos valores obtidos quando utilizado o licor de primeira pressão terem sido menores que os obtidos com o meio sintético, vale ressaltar que o material testado é um subproduto da indústria de suco concentrado de laranja, sendo, portanto um resíduo do

processo o qual deve sofrer um tratamento para reduzir a DBO (demanda bioquímica de oxigênio) antes de ser descartado.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

OBJETIVO

Neste capítulo são apresentadas as conclusões gerais após avaliação completa dos resultados obtidos durante a realização deste trabalho.

- ✓ Baseado no estudo de seleção das linhagens de leveduras através da dinâmica populacional pode-se dizer que houve uma seleção espontânea dentro do reator uma vez que todas as cepas, por apresentarem boas características fermentativas e floculantes, a princípio teriam possibilidade de permanecer no processo proposto. Entretanto, não se pode concluir qual foi o fator que levou a esse domínio.
- ✓ Para o desenvolvimento de um reator com leito fluidizado para uso industrial, se faz necessário além de estudos de concepção de projeto, estudos onde sejam considerados os tipos de levedura que se pretende utilizar assim como o tipo de matéria prima a ser processada.
- ✓ Os resultados obtidos mostram que os modelos que levam em consideração o efeito do substrato limitante, inibição pelo substrato e produto apresentaram o melhor ajuste aos dados experimentais.
- ✓ A inibição pelo produto mostrou-se linear para todos os modelos testados para as condições do ensaio com tempo de residência 2,92 h. Para os outros ensaios, o modelo não linear para este termo se mostrou mais adequado.
- ✓ A variação dos valores dos parâmetros dos modelos ajustados para os diferentes tempos de residência mostram que a expansão do leito varia de acordo com a quantidade de CO₂ liberado/ unidade de tempo (velocidade de conversão).
- ✓ Os resultados obtidos vem confirmar que os processos fermentativos que utilizam como fonte de carbono a sacarose, devem ser tratados como processos contendo dois substratos distintos, glicose e frutose, e ainda devem levar em consideração a preferência do microrganismo em consumir a glicose (diauxia).

- ✓ O rendimento e a produtividade apresentam comportamento antagônico para todos os ensaios realizados.
- ✓ Dentre os três arranjos estudados o arranjo 3 apresentou produtividade máxima de 27,39 g Etanol/L.h superior aos 26,29 g Etanol/L.h e 21,68 g Etanol/L.h dos arranjos um e dois respectivamente, sendo, portanto o arranjo selecionado como ótimo.
- ✓ É possível operar o sistema proposto otimizado com matérias-primas de uso industrial mantendo altas produtividades e rendimentos elevados.
- ✓ Com o sistema proposto é possível operar com altos rendimentos e altas produtividades sem a necessidade de se utilizar separadoras centrífugas.

CAPÍTULO 7

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar o comportamento do sistema proposto otimizado (Arranjo 3) em escala piloto, visando assim sua futura implementação industrial.
- Utilizar os modelos obtidos para futuros trabalhos de modelagem e projetos de scale-up.
- Testar o sistema proposto com méis mais esgotados (terceira massa).

CAPÍTULO 8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADMASSU, W.; KORUS, R.A; HEIMSCH, R.C. Ethanol fermentation with a flocculating yeast. Chem. Eng. Journal. V.31, n.1, p.B1-B8, 1985.
- AIBA, S.; SHODA, M.; NAGATAMI, M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. Biotechnol. Bioeng., 10: 845-864, 1968.
- AIBA, S.; SHODA, M. Reassessment of the product inhibition in alcohol fermentation. J. ferment. technol.; 47: 790-794, 1969.
- ALMEIDA, J.R. Processo de recuperação de levedura ou processo Melle-Boinott. In: SEMANA DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA, 1., 1960, Piracicaba. Anais. p. 254-262.
- AMORY, D. E., ROUXHET, P. G. ; DUFOUR, J. P.; Flocculation of brewery yeast and their surface properties: chemical composition, electrostatic charge and hydrophobicity. J. Inst. Brew. 84, p.79-84, 1988.
- ANDRIETTA, S.R. Modelagem, Simulação e Controle de Fermentação Alcoólica contínua em Escala Industrial. Campinas: FEA, UNICAMP, 1994. Tese (Doutorado)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1994.
- ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.S.; RODRIGUES, M. I. Método de caracterização de leveduras de processo utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. STAB Açúcar, Alcool e Subprodutos , v.13, n.4, p. 22-25, 1995.
- ANDRIETTA, S.R. ; MAUGERI FILHO, F. Optimum design of a continuous fermentation unit of an industrial plant alcohol production. Advances in Bioprocess Engineering, 1, : 47-52, 1994.
- BAYLEY, J. E.; OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals. 2ª ed. N. York, McGraw-Hill, 1986.
- BAZUA, C. D.; WILKE, C. R. Ethanol effects on the kinetics of a continuous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Bioeng. Symp., 7: 105-118, 1977.

- BONOMI, A.; ABOUTBOUL, H.; SCHIMITELL, W. Simulation of continuous fermentation of manioc hydrolisate. Biotechnol. Bioeng. Symp.; 11: 333-357, 1981.
- BORZANI, W. Fermentação alcoólica contínua. In: SEMANA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, 1., Piracicaba, 1960. Anais. p.263-276.
- BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. Statistics for experimenters. New York, Editora Wiley, 1978. 652 p.
- BRUNS, R.E.; SCARMINIO, I.S, NETO B.B. Planejamento e Otimização de Experimentos Campinas: Editora da Unicamp, 1995, 299 p.
- BU'LOCK, J.D. Practical advantages of very flocculent yeast for alcohol production in single and multiple continuous systems. Int. Spec. Symp. Yeast. England, v.8, A .186, 1983.
- CHEN, C.S; CHAN, E.; GONG, C.S; CHEN, L.F. Effect of sugar consumption on ethanol fermentation in a tower Fermentor packed with self-aggregating yeast: mathematical modeling and bed height. Applied Biochemistry and Biotechnology. V.39, n.40, p.491-508, 1993.
- CYSEWSKY, G. R.; WILKE, C. R. Process design and economic studies of alternative methods for the production of ethanol. Biotechnol. Bioeng., v.20, n.9, p.1421-1444, 1978.
- DENGIS, P. B., NELISSEN, L. R. and ROUXHET, P. G; Mechanisms of yeast flocculation: comparison of top- and bottom-fermenting strains. Appl. Environ. Microbiol 61, p. 718-728, 1995.
- DOURADO, A.; GOMA, G.; ALBUQUERQUE, U.; SEVELLI, Y. Modelling and static optimization of ethanol production in a cascade reactor. I. Modelling. Biotechnol. Bioeng.; v.29, n.2, p.187-194, 1987.
- DREWS, W. A. fermentação do melaço de cana de açúcar no Brasil. In: SIMPÓSIO DE FERMENTAÇÃO, 1., São Paulo, 1964. Anais. p.213-222.

- FINGUERUT, J.; CÉSAR, A. R. P.; LEINER, K. H.; VAZ ROSSEL, C. E. Fermentação contínua em múltiplos estágios. STAB Açúcar, Alcool e Subprodutos, 10 (3): 41-42, 1992.
- GHOSE, T. K.; THYAGI, R. D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysis I. Batch versus continuous systems. Biotechnol. Bioeng.; v.21, n.8, p.1387-1400, 1979.
- GUERREIRO, M.A. Desenvolvimento de um sistema especialista para o projeto de unidades industriais de produção de álcool. Tese de Mestrado, UNICAMP, 1995.
- HARSHBARGER, D.; BAUTZ, M.; DAVISON, B.H; SCOTT, T.C; SCOTT, C.D. Economic assessment of ethanol production comparing traditional and fluidized bed bioreactors. Applied Biochemistry and Biotechnology. v.51, n.52, p.593-604, 1995.
- JARZEBSKI, A. B.; MALINOWSKI, J. J.; GOMA, G. Modeling of ethanol fermentation at high yeast concentration. Biotechnol. Bioeng., v.34, n.9, p.1225-1230, 1989.
- JIN, C.K; CHIANG, H.L; WANG, S.S. Enzym.Microbiol.Technol. v.3, p.249, 1981.
- JIN, YU-LAI A.; SPEERS R. A. B. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*, Food Research International, Vol. 31, No. 6-7, p. 421-440, 1998.
- JONES, S.T.; ADMASSU, W.; KORUS, R.A.; HEIMSCH, R.C. Ethanol Fermentation in a Continuous Tower Fermentor. Biotechnol. Bioeng. V.26, n.7, pp.742-747, 1984.
- KHURI, A. I.; CORNELL, J.A. Responses Surfaces - Designs and Analyses. New York: ASQC Quality Press, 1987. 405 p.
- KURIYAMA, H.; SEIKO, Y.; MURAKAMI, T.; KOBAYASHI, H.; SONODA, Y. Continuous ethanol fermentation with cell recycling using flocculating yeast. Journal Ferment. Technol. V.63, n.2, pp.159-165, 1985.
- KURIYAMA, H.; ISHIBASHI, H.; MIYAGAWA, H.; KOBAYASHI, H.; MIKAMI, E. Biotechnology Letters. V.15, n.4, 1993

- LEE, C. W.; CHANG, H. N. Kinetics of ethanol fermentation in membrane cell recycle fermentors. Biotechnol. Bioeng., v.29, n.9, p.1105-1112, 1987.
- LEE, J. M.; POLLARD, J. F.; COULMAN, G. A. Ethanol fermentation with cell recycling: computer simulation. Biotechnol. Bioeng., v.25, n.2, p.497-511, 1983.
- LEVENSPIEL, O. Monod equation: a revised and a generalization to product inhibition situations. Biotechnol. Bioeng., v.22, n.8, p.1671-1687, 1980.
- LIMA, U.A. Sistema de fermentação alcoólica. In: SEMANA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, 1., Piracicaba, 1960. Anais. p.242-253.
- LUDWIG, K.M., OLIVA-NETO, P. and ANGELIS, D.F. de Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. Ciênc. Tecnol. Aliment., Jan 2001, vol.21, no.1, p.63-66.
- LUONG, J. H. T. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. Biotechnol. Bioeng.; v.27, n.3, p.280-285, 1985.
- MAIORELLA, B.L., BLANCH, H. W., WILKE, C. R. Economic evaluation of alternative ethanol fermentation processes. Biotechnol. Bioeng., v.26, n.9, p.1003-1025, 1984.
- MOULIN, G.; BOZE, H.; GALZY, P. Inhibition of alcoholic fermentation by substrate and ethanol. Biotechnol. Bioeng., v.22, n.11, p.2375-2381, 1980.
- NOVAK, M.; STREHAIANO, P.; MORENO, M.; GOMA, G. Alcoholic fermentation: on the inhibitory effect of ethanol. Biotechnol. Bioeng., v.23, n.1, p.201-211, 1981.
- OLIVEIRA, S.C; PAIVA, T.C.B.; VISCONTI, A.E.S; GIUDICI, R. Discrimination between ethanol inhibition models in a continuous alcoholic fermentation process using flocculating yeast. Applied Biochemistry and Biotechnology. V.74, n.3, pp. 161-172, 1998.
- PAIVA, T.C.B., SATO, S., VISCONTI, A.E.S., CASTRO, L.A.B. Continuous alcoholic fermentation process in a tower with recycling of flocculating yeast. Applied Biochemistry and Biotechnology. v.57, n.58, p.535-541, 1996.

- PRINCE, I. G.; BARFORD, J. P. Continuous Tower fermentation for power ethanol production. Biotechnology Letters. v.4, n.4, p.263-268, 1982.
- ROTTENBACKER, L., SCHOSSLER, M., BAUER, W. Modelling of solid-state fluidized bed fermenter for ethanol production with *S. cerevisiae*. Bioprocess Eng. v. 2, p.25-31, 1987.
- SCHLEGEL, H. G. *General Microbiology*. Cambridge University Press. 7° ed., p.214, 1990.
- SPEERS, R. A.; RITCEY, L. L. Towards an ideal flocculation assay. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 53, p.174-177, 1995.
- SEVELY, Y.; PORCIEL, J.P.; RAUZY, G.R, BABANS J.P. paper presented at the 8 th Trienal International Congress, Kyoto, Japan, Aug. 1981.
- STRATFORD, M. Yeast Flocculation: restructuring the theories in line with recent research. *Cerevisia* 21, p.38-45, 1996.
- THATIPAMALA, R.; ROHANI, S.; HILL, G. A. Effects of high product and substrate inihition on the Kinects in biomass and products yields during ethanol batch fermentation. Biotechnol. Bioeng.; v.40, n.2, p.289-297, 1992.
- TOSETTO, G.M. Influência da Matéria-Prima no Comportamento Cinético de Levedura na Produção de Etanol. Campinas: FEQ, UNICAMP, 2002. Tese (Mestrado)- Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002.
- VIEGAS, M.C. Desenvolvimento de um Reator de Bancada de Leito Fluidizado para Produção de Etanol Utilizando Linhagens de Leveduras Floculantes. Campinas: FEQ, UNICAMP, 1999. Tese (Mestrado)- Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999.
- VIEGAS, M.C.; ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.;. Use of tower reactors for continuous ethanol production, Brazilian Journal of Chemical Engineering. v.19, n.02, pp.167-173,2002.

ZARPELLON, F.; ANDRIETTA, S. R. Fermentação contínua para produção de álcool.
STAB Açúcar, Alcool e Subprodutos, 10 (4): 23-28, 1992.